

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
MARIE-CLAUDE DÉRY, B.Sc. (Biologie médicale)**

**RÉGULATION DE L'APOPTOSE DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES
DURANT LE CYCLE OESTRAL CHEZ LE RAT**

AVRIL 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

L'important ne réside pas dans le fait "d'être quelqu'un",
mais d'être tout simplement soi-même.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Éric Asselin, pour la confiance témoignée au cours de ces deux années. À ses côtés, j'ai développé le goût de la recherche, le souci du travail bien exécuté et le dépassement personnel. Je tiens à le remercier pour tout le support qu'il m'a apporté tout au long de la maîtrise, pour l'autonomie permise au laboratoire ainsi que pour le congrès international auquel j'ai pu assister. Merci infiniment.

Une pensée spéciale et mes remerciements à toutes mes amies du laboratoire de physiologie de la reproduction et du cancer, pour leur support, leur amitié et pour tous les bons moments. Ici, dans la conjugaison du mot « ami » le genre féminin l'emporte en espérant que le seul représentant masculin se reconnaisse quand même ! Un remerciement tout particulier pour Sophie, qui se dévoue si fidèlement à notre cause, pour tous ses précieux conseils et sa perspicacité.

Plusieurs autres personnes, en dehors du laboratoire, contribuent régulièrement à mon bonheur et m'aident à parcourir mon petit bout de chemin. Je pense plus précisément à Pierre, mon homme, mon amour et à mes parents, deux êtres vraiment fantastiques sans qui, bien des choses n'auraient pu être possibles. Je ne pourrai pas nommer et remercier ici tous les gens qui embellissent ma vie, toutefois, je sais que vous vous reconnaîtrez. Mille fois merci.

RÉSUMÉ

Chez les espèces à placentation hémochoriale (rongeurs, primates et humains), l'embryon s'implante profondément dans l'endomètre de l'utérus et possède des propriétés invasives. Peu avant l'implantation, les cellules endométriales prolifèrent et se différencient en réponse aux hormones sexuelles, un processus appelé décidualisation. Lorsque l'embryon entre en contact avec l'endomètre, les cellules déciduales entrent en apoptose afin de libérer l'espace requis pour son implantation. Toute altération de ces processus entraîne des complications, voire l'arrêt de la gestation.

Les mécanismes qui contrôlent l'apoptose au niveau de l'endomètre sont quasi inconnus. Le but de ce travail de maîtrise était d'étudier la régulation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt durant le cycle oestral. Cette voie de signalisation est normalement impliquée dans les processus apoptotiques. Notre modèle animal, le rat, nous permet de par son cycle oestral court (4-5 jours) de simplifier considérablement l'étude et l'observation du cycle hormonal. Nous avons utilisé des techniques d'immunohistochimie, de TUNEL, d'extraction de protéines et d'analyses de type Western Blot. Pour déterminer l'effet du 17β -estradiol, nous avons ovariectomisé les rates puis procéder à des injections de l'hormone selon des doses et un protocole pré-établis.

Les travaux actuels ont démontré, pour la première fois, l'implication de la voie de signalisation cellulaire PI 3-K/Akt dans la régulation de l'apoptose au niveau de l'endomètre chez le rat. Akt, qui est une protéine sérine/thréonine kinase capable de bloquer plusieurs protéines pro-apoptotiques lorsqu'elle est phosphorylée, voit son expression régulée par le 17β -estradiol. La phosphorylation de Akt est inhibée par la protéine PTEN, une phosphatase impliquée dans la déphosphorylation de PIP_3 en PIP_2 . La voie de NF-kappaB, régulée par Akt, active la transcription des gènes de la famille des IAPs, des inhibiteurs de l'apoptose, tel que XIAP. Malgré la présence de PTEN et NF-kappaB durant le cycle, aucune de ces protéines ne montre une variation significative de leurs expressions. XIAP, qui est une protéine anti-apoptotique, est

fortement exprimée en estrus lorsqu'il y a le maximum d'apoptose mais très peu en proestrus, phase de la prolifération cellulaire. Son principal inhibiteur Smac/DIABLO atteint son niveau d'expression le plus bas en estrus. XIAP et Smac/DIABLO sont régulés par le 17β -estradiol mais de façon diamétralement opposée.

Ces résultats suggèrent la présence d'un mécanisme qui pourrait protéger les cellules endométriales contre un processus apoptotique non-ciblé. Également, nous pouvons suspecter la présence d'une phosphatase inconnue qui pourrait empêcher la phosphorylation de Akt en estrus. Des analyses supplémentaires seront nécessaires dans le but de déterminer plus spécifiquement, les effecteurs intra-cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus d'apoptose au niveau de l'endomètre du rat.

TABLE DES MATIÈRES

| | Pages |
|---|--------------|
| REMERCIEMENT..... | II |
| RÉSUMÉ..... | III |
| TABLE DES MATIÈRES..... | V |
| LISTE DES TABLEAUX..... | VII |
| LISTE DES FIGURES..... | VIII |
| LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS..... | X |
| <u>CHAPITRE 1</u> INTRODUCTION..... | 2 |
| 1.1 Cycle oestral chez le rat..... | 3 |
| 1.1.1 Anatomie et histologie utérine..... | 3 |
| 1.1.2 Les hormones stéroïdiennes..... | 6 |
| 1.1.3 Les phases du cycle oestral chez le rat..... | 10 |
| 1.1.4 Régulation du cycle oestral..... | 12 |
| 1.2 L'apoptose et la survie cellulaire..... | 16 |
| 1.2.1 Bref historique..... | 16 |
| 1.2.2 Caractéristiques biochimiques et morphologiques..... | 17 |
| 1.2.3 Apoptose versus nécrose..... | 18 |
| 1.3 Présentation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt..... | 20 |
| 1.3.1 PI 3-K..... | 20 |
| 1.3.2 Akt/PBK/Rac..... | 22 |
| 1.3.3 PTEN/MMAC..... | 26 |
| 1.3.4 BCL-2, BCL-XL, BAD, BID et BAX..... | 27 |
| 1.3.5 Les caspases..... | 30 |
| 1.3.6 XIAP..... | 31 |
| 1.3.7 IκB, P-IκB et NF-κB..... | 33 |
| 1.4 Objectifs..... | 34 |

**CHAPITRE II REGULATION OF AKT EXPRESSION AND
PHOSPHORYLATION BY 17 β -ESTRADIOL IN THE RAT
UTERUS DURING ESTROUS CYCLE**

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Préface..... | 37 |
| Résumé..... | 38 |
| Abstract..... | 41 |
| Introduction..... | 42 |
| Matériel et Méthodes..... | 43 |
| Résultats..... | 46 |
| Discussion..... | 48 |
| Remerciements..... | 51 |
| Références..... | 52 |

**CHAPITRE III OPPOSITE REGULATION OF XIAP AND
SMAC/DIABLO IN THE RAT ENDOMETRIUM IN
RESPONSE TO 17BETA-ESTRADIOL AT ESTRUS**

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Préface..... | 67 |
| Résumé..... | 68 |
| Abstract..... | 70 |
| Introduction..... | 71 |
| Matériel et Méthodes..... | 73 |
| Résultats..... | 75 |
| Discussion..... | 77 |
| Remerciements..... | 81 |
| Références..... | 82 |

CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 96

| | |
|------------------------|------------|
| RÉFÉRENCES..... | 102 |
|------------------------|------------|

LISTE DES TABLEAUX

| | Pages |
|---|--------------|
| <u>Tableau 1.1</u> Différence générale entre l'apoptose et la nécrose..... | 18 |

LISTE DES FIGURES

| | Pages |
|---|--------------|
| <u>Figure 1.1</u> Comparaison anatomique entre l'utérus de rat et celui de la femme | 4 |
| <u>Figure 1.2</u> Coupe histologique d'un utérus humain..... | 5 |
| <u>Figure 1.3</u> Les voies de la stéroïdogénèse ovarienne..... | 7 |
| <u>Figure 1.4</u> Les phases du cycle oestral..... | 11 |
| <u>Figure 1.5</u> Régulation de la fonction ovarienne..... | 13 |
| <u>Figure 1.6</u> Profils hormonaux de la rate pendant le cycle oestral..... | 15 |
| <u>Figure 1.7</u> Microscopie d'une cellule normale et d'une cellule apoptotique | 18 |
| <u>Figure 1.8</u> Différence microscopiques entre la nécrose et l'apoptose..... | 21 |
| <u>Figure 1.9</u> La voie de signalisation de PI 3-K/Akt..... | 23 |
| <u>Figure 1.10</u> Les voies de conversions des phosphoinositides..... | 24 |
| <u>Figure 2.1</u> Prolifération and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle by Western analysis..... | 59 |
| <u>Figure 2.2</u> Prolifération and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle par TUNEL and IHC..... | 60 |
| <u>Figure 2.3</u> Apoptotic and proliferative endometrial count during estrous cycle..... | 61 |
| <u>Figure 2.4</u> Expression of Akt, Phospho-Akt and PTEN during estrous cycle..... | 62 |

| | | |
|--------------------------|---|-----------|
| <u>Figure 2.5</u> | IHC of Akt, Phospho-Akt and PTEN in rat endometrium during estrous cycle..... | 63 |
| <u>Figure 2.6</u> | Expression of CDC47/MCM7, Akt, Phospho-Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium..... | 64 |
| <u>Figure 2.7</u> | IHC of CDC47/MCM7, Akt and Phospho-Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium..... | 65 |
| <u>Figure 3.1</u> | Cleaved caspase 3 –6 –7 expression in rat endometrium During estrous cycle..... | 89 |
| <u>Figure 3.2</u> | Smac/DIABLO and XIAP expression in rat endometrium during estrous cycle..... | 90 |
| <u>Figure 3.3</u> | Immunohistochemical of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium during estrous cycle..... | 91 |
| <u>Figure 3.4</u> | Expression of cleaved caspase 3 –6 –7, Smac/DIABLO and XIAP in response to 17 β -estradiol in rat ovariectomized..... | 92 |
| <u>Figure 3.5</u> | IHC of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium of treated ovariectomized rat..... | 93 |
| <u>Figure 3.6</u> | NF-kappaB and Phospho-IkB expression in rat endometrium during estrous cycle..... | 94 |

LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS

| | |
|------------------------------|---|
| PI 3-K | Phosphatidylinositol 3 kinase |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling |
| PTEN/MMAC | Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten / mutated in multiple advanced cancers |
| PIP ₃ | Phosphoinositol triphosphate |
| PIP ₂ | Phosphoinositol diphosphate |
| IAPs | Inhibitor of apoptosis proteins |
| XIAP | X-linked inhibitor of apoptosis protein |
| Smac/DIABLO | Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP binding protein low pl |
| DHEA | Déhydroépiandrosterone |
| LH | Hormone lutéinisante |
| FSH | Hormone Folliculo-stimulante |
| E ₂ | 17β-estradiol |
| E ₁ | Oestrone |
| E ₃ | Oestriol |
| Gn-RH | Gonadolibérine |
| ER | Récepteurs des œstrogènes |
| ERα | Récepteurs à l'œstrogène alpha |
| ERβ | Récepteurs à l'œstrogène bêta |
| PR | Récepteurs de la progestérone |
| PR-A | Récepteurs à la progestérone de type A |
| PR-B | Récepteurs à la progestérone de type B |
| ARN | Acides ribonucléiques |
| ARNm | ARN messenger |
| ADN | Acides désoxyribonucléiques |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| kDa | Kilodalton |
| kb | Kilobases |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| PtdIns | Phosphatidylinositol |
| PtdIns 4-P | Phosphatidylinositol 4 phosphates |
| PtdIns (4,5)P ₂ | Phosphatidylinositol 4,5 diphosphates |
| PtdIns (3,4,5)P ₃ | Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate |
| Akt/PKB/Rac | Activated by kinase tyrosine / Protein B Kinase / Related to A and C protein kinase |
| P-Akt | Phosphorylated Akt |
| PDKs | Phosphoinositides-kinases dépendantes |
| LY294002 | 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone |
| PH | Pleckstrin homology |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BAD | BCL2-antagonist of cell death |

| | |
|--------------------|--|
| BAX | BCL2-associated X protein |
| BCL-X _L | BCL2-like 1 |
| AIF | Apoptosis inducing protein |
| Apaf-1 | Apoptotic protease-activating factor-1 |
| Caspases | Cysteine aspartic acid-specific proteases |
| CARDs | Caspase recruitment domains |
| DED | Death effector domain |
| BIRs | Baculovirus IAP repeats |
| cIAP-1 | Mammalian IAP homolog B |
| cIAP-2 | Mammalian IAP homolog C |
| NAIP | Neuronal apoptosis inhibitory protein |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| I κ B | Inhibitory subunit kappa B |
| P-I κ B | Phosphorylated Inhibitory subunit kappa B |
| XAF-1 | XIAP-associated factor 1 |
| Rel/NF- κ B | Related to Nuclear Factor Kappa B |
| RHD | Rel homology domain |
| IHC | Immunohistochimie |
| CDC47/MCM7 | Cell division cycle 47 / Mini Chromosome Maintenance protein 7 |
| Vol. | Volume |
| pp. | Page |
| et al. | Plus d'un auteur |
| min. | Minute |
| fig. | Figure |
| °C | Degré celsius |
| POD | Péroxidase |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| g | gramme |
| μ g | microgramme |
| kg | kilogramme |
| μ m | micromètre |
| mM | milli molaire |
| PBS | Phosphate buffer salt |
| BSA | Bovine serum albumine |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| EGF | Epidermal growth factor |
| IGF-1 | Insulin growth factor-1 |
| ENOS | Endothelial nitric oxide synthase |
| GH | Growth hormone |
| WT | Wild-type |
| Alpha ERKO | Alpha estrogen receptor knock-out mice |
| CHO | Chinese Hamster Ovary Cells |
| TNF- α | Tumor necrosis factor alpha |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| PARP | Poly ADP-ribose polymerase |
| 2ME2 | 2-Methoxyestradiol |
| DR5 | Death receptor 5 |

| | |
|---------------|---|
| TRAIL | Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand |
| GSK-3 β | Glycogen synthase kinase 3 beta |
| FKHR | Forkhead transcription factor |

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chez les espèces à placentation hémo-choriale (rongeurs, primates, humains), le blastocyte doit s'implanter précocement dans l'utérus afin de poursuivre son développement (entre le cinquième et le septième jour suivant l'ovulation). L'invasion de l'endomètre utérin est maximale avec érosion de l'endothélium vasculaire et l'implantation est très profonde : la pénétration du blastocyte (ou nidation) dans le stroma utérin est complète.

L'implantation du blastocyte implique des transformations majeures de l'endomètre sous l'action des st ro ides ovariens ( strog ne et progestérone), un processus appelé décidualisation. Cette réaction est caractérisée par une prolifération accrue des cellules du stroma endométrial et leur différenciation en cellules déciduales, qui deviennent alors sécrétrices d'hormones tout comme les cellules épithéliales. Lors de l'implantation, les cellules épithéliales vont mourir par apoptose (mort cellulaire programmée) afin de permettre à l'embryon de s'implanter adéquatement en libérant l'espace nécessaire à sa prolifération. Le tissu décidual joue donc un rôle important dans le contrôle de l'envahissement du blastocyte et du développement du placenta.

Les modalités de l'implantation nécessitent : (a) une synchronisation précise entre le développement du blastocyte et la réceptivité utérine, (b) une transformation profonde de l'endomètre et, (c) une régulation efficace des processus apoptotiques. Toute altération de ces processus entraîne des complications voir l'arrêt de la gestation.

Les mécanismes de régulation de l'apoptose dans les cellules endométriales sont quasi inconnus à ce jour et constituent l'essentiel de ce travail dont l'étude se limite   la régulation de l'apoptose pendant le cycle oestral chez le rat.

1.1 LE CYCLE OESTRAL CHEZ LE RAT

Contrairement à la femme, il n'y a pas de saignement utérin ou menstruation chez le rat : l'élimination de couches externes de l'endomètre n'entraîne pas de phénomènes vasculaires visibles, donc pas d'hémorragies. Les cellules de la muqueuse utérine se dégradent par apoptose. L'évaluation du cycle est basée sur la cytologie des frottis vaginaux (Freeman et al., 1994).

Le cycle oestral du rat est court : de 4 à 5 jours. Dans l'environnement contrôlé des laboratoires, les cycles peuvent se succéder toute l'année (Bazer et al., 1998). Le rat est utilisé comme modèle animal dans notre étude parce qu'il partage certaines similitudes avec l'humain, dont : (a) l'ovulation spontanée, c'est à-dire, ovulation même en l'absence de mâle ou stimuli sexuels, (b) l'implantation de type hémochoriale, et (c) un placenta discoïde où seule la partie invasive du conceptus participe à la formation du placenta (Levasseur et al., 2001).

1.1.1 Anatomie et histologie utérine

L'utérus des rongeurs est caractérisé par la présence d'un utérus double avec deux cols utérins et un seul vagin (figure 1.1). Les deux cornes utérines sont entièrement séparées sur toute la longueur. Les trompes de Fallopes sont minces, démesurément longues et enroulées sur elles-mêmes, les ovaires sont petits, ronds et enveloppés dans du tissu adipeux, rattachés aux cornes utérines via les oviductes (Waynforth et al., 1992).

Dans la majorité des espèces, la totalité de la surface endométriale est compétente pour l'implantation. La muqueuse endométriale est constituée d'un épithélium luminal et glandulaire mono ou pseudo-stratifié, séparé du stroma conjonctif par une lame basale. L'épithélium luminal est composé de cellules dont la surface est hérissée de microvillosités et de cellules ciliées plus abondantes aux abords des orifices glandulaires (figure 1.2) (Levasseur et al., 2001).

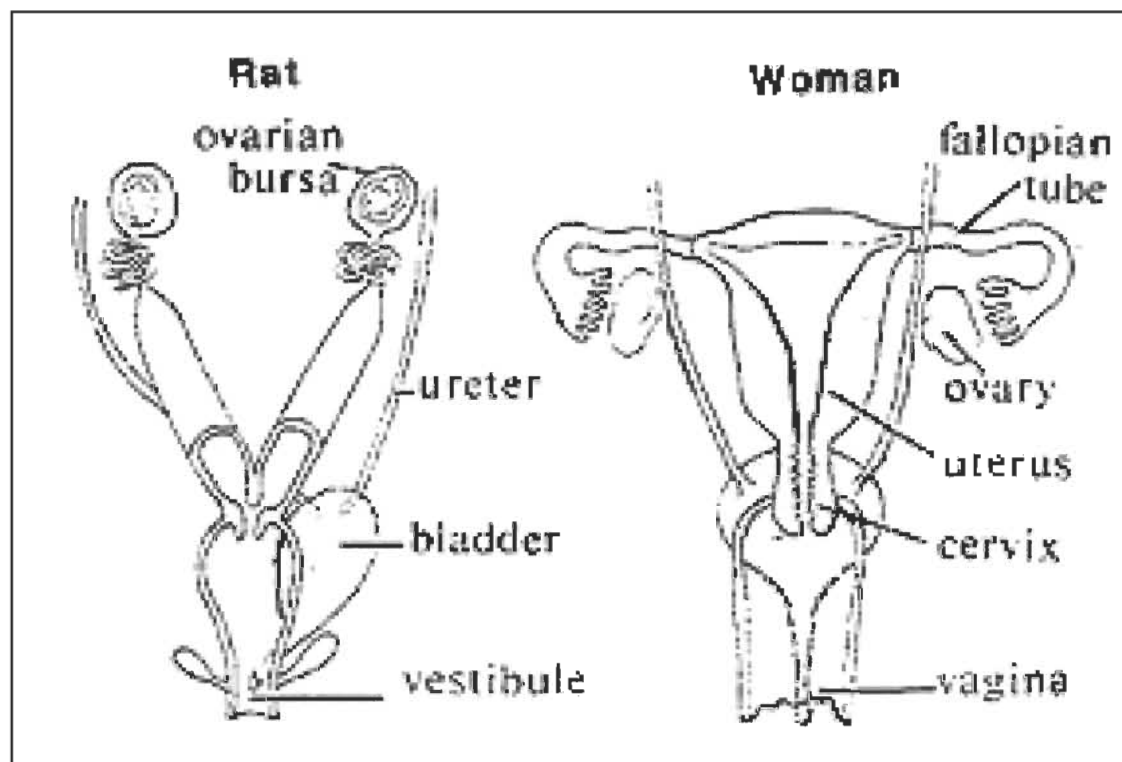


FIGURE 1.1 : Comparaison anatomique entre l'utérus du rat et celui de la femme. Les proportions réelles des utérus ne sont pas respectées dans ce schéma. (Parrish, 2000)

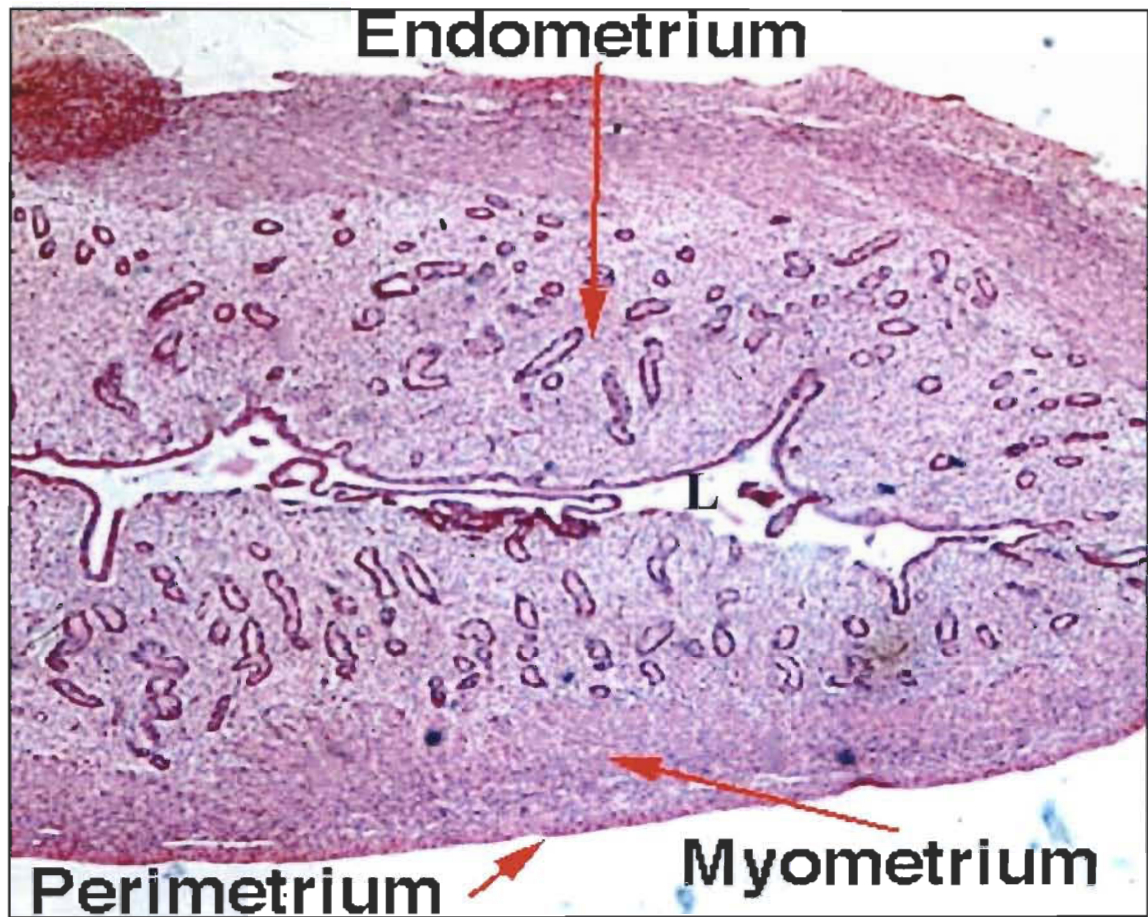


FIGURE 1.2 : Coupe histologique d'un utérus humain indiquant les trois grandes régions anatomiques, soit de l'intérieur vers l'extérieur : (a) l'endomètre, (b) le myomètre et (c) le périmètre. L= lumière utérine (Parrish, 2000)

Le myomètre est constitué de cellules musculaires lisses entourées d'un tissu conjonctif organisé en plans musculaires distincts : (a) une couche interne dont l'orientation est à prédominance circulaire en contact avec le stroma ou la décidue, (b) une couche externe longitudinale située sous la séreuse et, (c) une couche moyenne caractérisée par l'abondance de la vascularisation.

Une séreuse recouvre la plus grande partie de l'utérus, le reste est lié aux tissus voisins par une adventice (Gartner et al., 1992).

1.1.2 Les hormones stéroïdiennes (17 β -estradiol et progestérone)

Les hormones stéroïdiennes femelles directement impliquées dans le contrôle de la reproduction sont les oestrogènes et la progestérone. Elles appartiennent à une famille d'hormones dérivées du cholestérol et métabolisées dans les ovaires.

Les étapes successives de la stéroïdogénèse à partir du cholestérol font intervenir en premier lieu les mitochondries des cellules de la thèque interne des follicules ovariens : le cholestérol est converti en prégnénolone à l'aide du cytochrome P-450_{sc} (side chain clivage) (figure 1.3). Au niveau du réticulum endoplasmique, le cytochrome P-450 C17 permet la biosynthèse des androgènes en transformant la prégnénolone soit en progestérone, qui sert d'intermédiaire à la production d'androsténédione, soit en déhydroépiandrostérone (DHEA) (Levasseur et al., 2001).

En deuxième lieu, les androgènes sont métabolisés en oestrone et/ou en 17 β -estradiol au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la granulosa des follicules ovariens à l'aide du cytochrome P-450 aromatasase. L'activité des cellules de la thèque interne est régit par l'hormone lutéinisante (LH) et celle des cellules de la granulosa par l'hormone folliculostimulante (FSH) (Knobil et al., 1994).

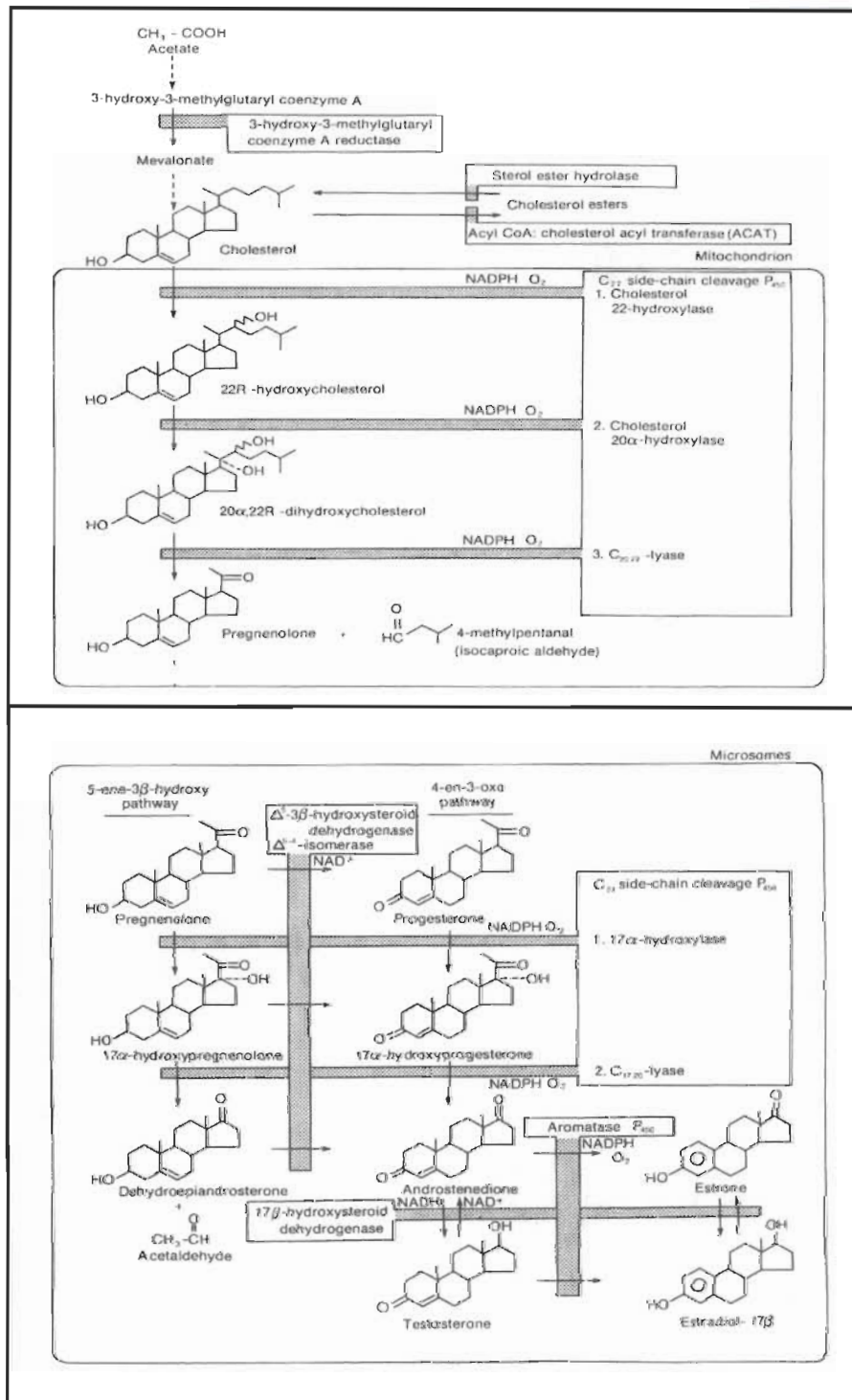


FIGURE 1.3 : Les voies de la stéroïdogénèse ovarienne (Knobil, et al., 1994)

Les oestrogènes sont présents dans l'organisme sous trois formes, soit (a) le 17β -estradiol (E_2), la forme la plus active, (b) l'œstrone (E_1), qui se convertit en 17β -estradiol et, (c) l'œstriol (E_3), qui est le produit de dégradation des deux autres formes d'oestrogènes.

Pendant toute l'enfance, un peu d'oestrogène est continuellement sécrété ce qui inhibe la libération de Gn-RH (gonadolibérine) par l'hypothalamus. À l'approche de la puberté, l'hypothalamus devient moins sensible aux oestrogènes et commence à sécréter de la Gn-RH selon un mode cyclique. La Gn-RH stimule la libération de FSH et LH par l'adénohypophyse. Au moment de la puberté chez la jeune fille, normalement vers l'âge de douze ans, les oestrogènes vont provoquer une poussée de croissance qui fait que les filles grandissent beaucoup plus vite que les garçons du même âge. Cette poussée de croissance est assez courte, parce que les oestrogènes provoquent aussi la soudure des cartilages de conjugaison des os longs et la féminisation du squelette. L'imprégnation en 17β -estradiol entraîne l'apparition des caractères sexuels secondaires féminins : (a) le développement des seins, (b) la répartition du tissu adipeux et des muscles, (c) l'élargissement et l'allègement du bassin, (d) la libido, (e) le développement des organes génitaux externes et internes. De plus, le 17β -estradiol (f) active l'ovogenèse et intervient dans le processus de maturation des follicules ovariens ainsi qu'au niveau de l'ovulation, (g) active la phase proliférative du cycle menstruel au niveau de l'utérus, (h) stimule la production de la glaire cervicale aqueuse du col du vagin et (i) stimule la capacitation du spermatozoïde dans les voies génitales grâce à son effet sur les sécrétions vaginales, utérines et tubaires.

Sous l'influence des hormones adénohypophysaires FSH et LH (gonadotropines), les oestrogènes sont synthétisés par les ovaires mais également par le placenta au cours de la grossesse. De plus, elles peuvent être produites par les glandes surrénales mais en plus faible quantité.

La progestérone est sécrétée par le corps jaune, un organe temporaire apparaissant à la suite de la rupture du follicule ovarien composé de cellules de la granulosa et de la

thèque pendant la seconde phase du cycle, par le placenta durant la grossesse, et à un moindre degré par les corticosurrénales et les ovaires (Larousse, Bordas, 1998).

La progestérone agit de concert avec le 17β -estradiol dans l'établissement et la régulation du cycle. Son rôle principal est de favoriser la nidation de l'ovule fécondé et la gestation. Elle modifie les caractères vasculaires et chimiques de la muqueuse utérine pour la rendre propice à l'implantation de l'œuf dans l'utérus. Elle provoque en outre les modifications de la glaire cervicale pour la rendre visqueuse. La progestérone exerce d'autres effets importants au cours de la grossesse : (a) elle inhibe la motilité de l'utérus, (b) maintient l'importante vascularisation de la muqueuse utérine et, (c) prépare les glandes mammaires à la lactation.

En dehors de la grossesse, la progestérone a d'autres actions : (a) elle a un effet sédatif sur le système nerveux central et, (b) est responsable du décalage thermique après l'ovulation (Marieb, 1999).

La réponse des tissus aux stéroïdes ovariens est imputable à la présence et à l'expression des différents isotypes des récepteurs d'œstrogène et de progestérone ($ER\alpha$, $ER\beta$, PR-A et PR-B) dans l'utérus. En général, l'expression des récepteurs ER et PR augmente suivant la phase proliférative et diminue lors de la phase sécrétrice du cycle (Snijders et al., 1992). Le récepteur $ER\alpha$ apparaît comme l'isotype des ER le plus abondant et est absolument essentiel pour une fonction utérine normale (Krege et al., 1998). Au niveau des récepteurs de la progestérone, PR-A et PR-B ont des rôles distincts dans l'endomètre. PR-A est impliqué dans le processus de décidualisation des cellules stromales en préparation à l'implantation tandis que PR-B est un fort régulateur de la prolifération cellulaire (Gao et al., 2000). L'augmentation du niveau du 17β -estradiol induit l'expression des récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$ ainsi que la transcription des gènes pour les récepteurs de la progestérone. La progestérone augmente la stabilité de l'ARN messager de ses récepteurs résultant en une hausse de l'expression des PRs (Tseng et al., 1997).

1.1.3 Les phases du cycle oestral chez le rat

Pour plusieurs espèces, le cycle d'activité de l'ovaire n'est identifiable que par les variations cycliques des niveaux plasmatiques d'estradiol et de progestérone. Chez le rat, la cytologie des frottis vaginaux permet d'évaluer le cycle facilement et rapidement.

Le cycle se divise en quatre phases successives (figure 1.4):

1- L'estrus : Permet de caractériser le début du cycle par l'unique présence de cellules épithéliales cornifiées ou kératinisées (cellules anucléées), cette phase peut durer entre dix et vingt heures et fait suite à la décharge de FSH/LH qui provoque l'ovulation;

2- Le métestrus ou D1 : D'une durée approximative de huit heures, le frottis de cette phase révèle la présence de (a) cellules épithéliales cornifiées en quantité moindre que l'estrus, (b) quelques cellules nucléées (cellules épithéliales rondes) et, (c) des leucocytes polymorphonucléaires en faible quantité;

3- Le diestrus ou D2 : Cette phase est caractérisée par la présence innombrable de leucocytes polymorphonucléaires qui envahissent la lumière vaginale et détruisent les cellules cornifiées. Cette phase dure normalement huit heures;

4- Le proestrus : D'une durée totale de soixante-douze heures, cette phase se divise en deux portions : – early proestrus, (a) les leucocytes polymorphonucléaires, (b) les cellules nucléées et, (c) quelques cellules épithéliales cornifiées sont présentes avec du mucus souvent abondant, cette phase a une durée de soixante heures – late proestrus, cette phase préparatoire à l'ovulation (décharge ovulante) dure approximativement douze heures et est caractéristique par la présence de cellules nucléées et ce, en très grande quantité (Waynforth et al., 1992). C'est le début de l'acceptation du mâle pour l'accouplement qui persiste pendant les premières heures de l'estrus.

Le proestrus est une phase de prolifération cellulaire au niveau de la muqueuse utérine et également une phase folliculaire, c'est-à-dire, une phase durant laquelle se développe

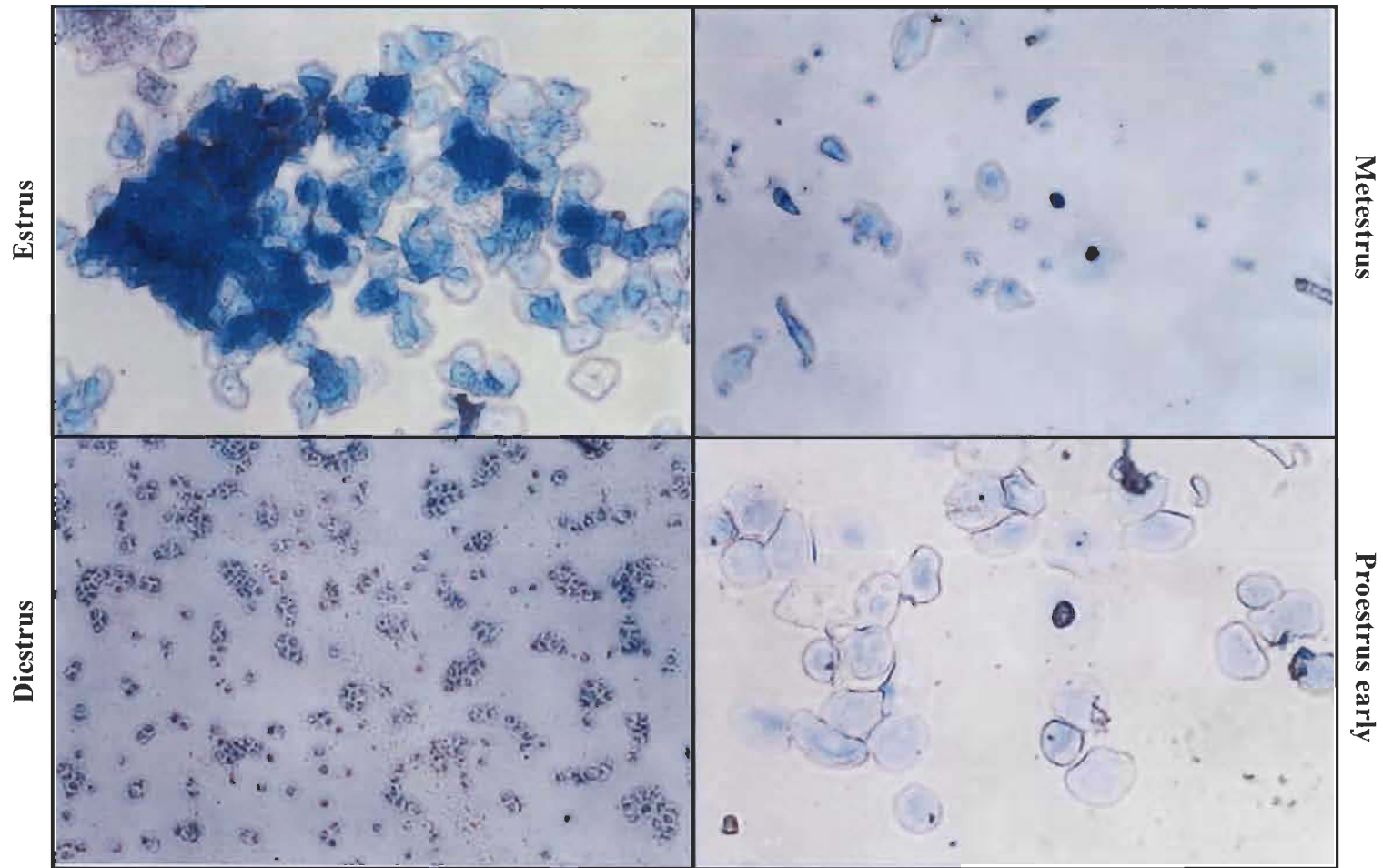


FIGURE 1.4 : Les phases du cycle oestral du rat. On n'observe pas dans le frottis vaginal d'autres mammifères des populations cellulaires aussi homogènes permettant d'identifier les stades du cycle (Levasseur et al., 2001) (photos laboratoire d'Éric Asselin).

les follicules pour une future ovulation. L'ovulation se produit au tout début de l'estrus marquant la fin de la phase folliculaire et le début de la phase lutéale qui se termine avec le diestrus (Levasseur et al., 2001).

1.1.4 Régulation du cycle oestral

Les cycles ovariens se manifestent chez le rat dès la puberté, qui survient vers l'âge de six à onze semaines (Waynforth et al., 1992), jusqu'à l'apparition de dérèglements de la fonction gonadotrope chez la femelle âgée.

La fonction de reproduction est contrôlée par le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'augmentation du taux de gonadolibérine (Gn-RH), régulateur de l'expression des gènes gonadotropiques sécrété par l'hypothalamus, stimule la sécrétion et la libération de la FSH et LH par l'adénohypophyse (figure 1.5). Ces deux hormones stimulent le développement, les capacités de synthèse et la maturation de tous les follicules gonado-dépendants ayant quitté la réserve folliculaire (environ 10 par jour chez la rate adulte) mais ne sont pas impliqués dans l'initiation de la croissance folliculaire. La LH stimule les cellules thécales qui sécrètent alors des androgènes qui diffusent à travers la membrane basale où ils sont transformés en oestrogènes par les cellules de la granulosa sensibilisées par la FSH.

L'inhibine sécrétée par les cellules de la granulosa ainsi que la faible augmentation de la concentration plasmatique d'oestrogènes exerce une rétro-inhibition sur la libération des gonadotropines par l'adénohypophyse. Toutefois, cette dernière maintient et accumule sa production de FSH et LH. Une sélection des follicules en cours de maturation se produit et le nombre de follicules est réduit au nombre d'ovulations caractéristique de la race ou de l'espèce (entre 6 et 10 chez la rate). Survient alors l'atrésie des autres follicules et le blocage du recrutement folliculaire (Levasseur et al., 2001). La croissance des follicules pré-ovulatoires entraîne une augmentation importante de la concentration d'oestrogènes qui exerce alors une rétro-activation sur le

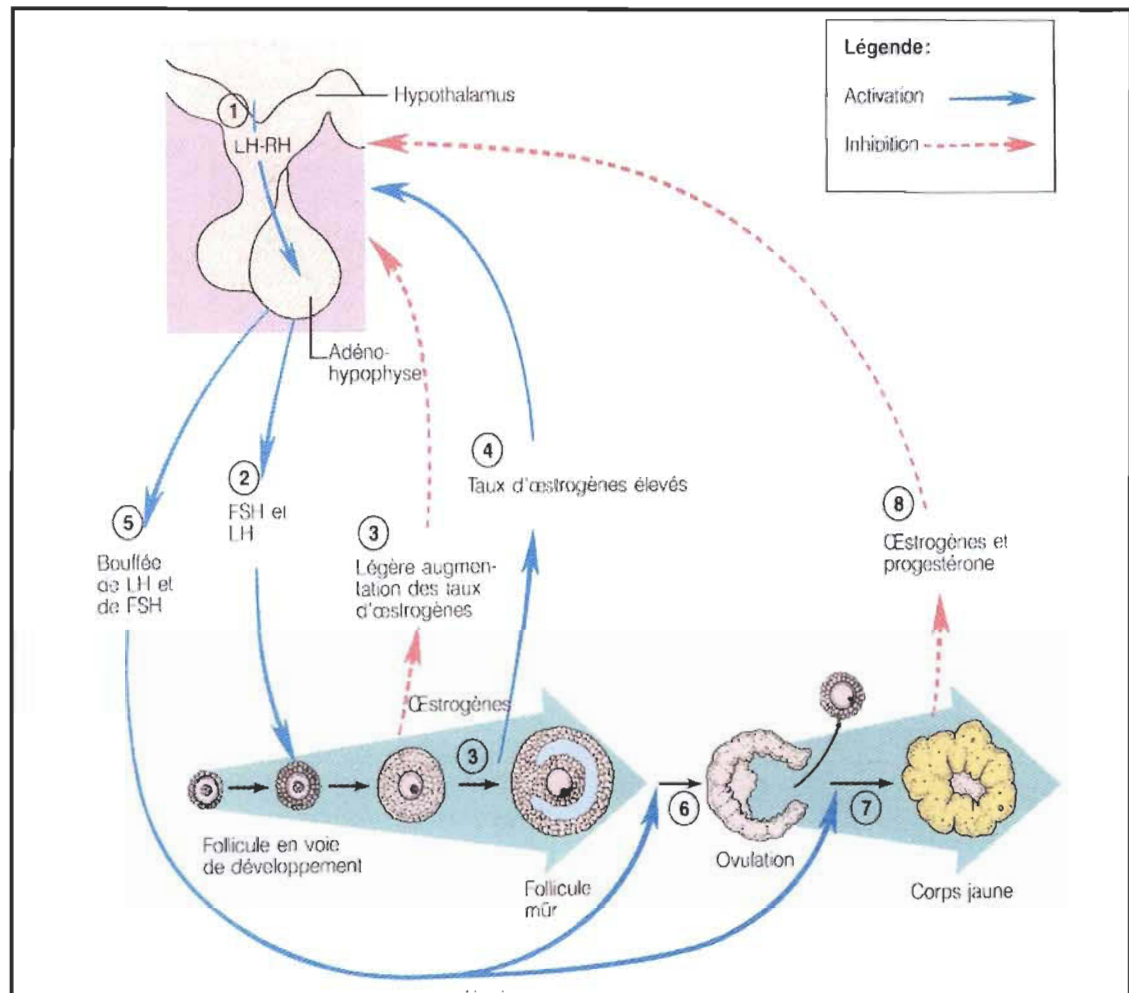


FIGURE 1.5 :Enchaînement des rétroactions réglant la fonction ovarienne (Marieb, 1999).

complexe hypothalamo-hypophysaire. L'adénohypophyse libère brusquement une grande quantité de LH, et de la FSH (en moindre proportion), ce qui produit la décharge ovulante nécessaire à l'expulsion de l'ovule hors du follicule ovarique mûr.

Sous l'effet de la LH, le follicule rompu se transforme en glande endocrine sécrétant principalement de la progestérone et un peu d'œstrogène. La sécrétion de ces deux hormones provoque une puissante rétro-inhibition sur la libération de la FSH et LH par l'adénohypophyse. La diminution graduelle du taux sanguin de LH supprime le stimulus de l'activité du corps jaune, qui commence alors à dégénérer.

L'arrêt de l'activité du corps jaune s'accompagne de l'arrêt de la sécrétion des hormones ovariennes ce qui met fin à l'inhibition de la sécrétion de FSH et LH : un nouveau cycle peut commencer (Marieb, 1999).

Le cycle hormonal de la rate comporte deux particularités imputables à son cycle court (Levasseur et al., 2001) (figure 1.6) :

- a) La chute brutale des concentrations d'inhibine immédiatement après l'ovulation entraîne un deuxième pic de FSH, ce qui stimule la formation de l'antrum des follicules qui ovuleront au cycle suivant, 3 jours plus tard;
- b) Le corps jaune a une activité fonctionnelle très brève, les niveaux de progestérone ne sont élevés qu'entre le métrus et le diestrus. Bien que non fonctionnels, les corps jaunes ne régressent que très lentement. Plusieurs populations de corps jaunes d'âges décroissants sont visibles sur l'ovaire.

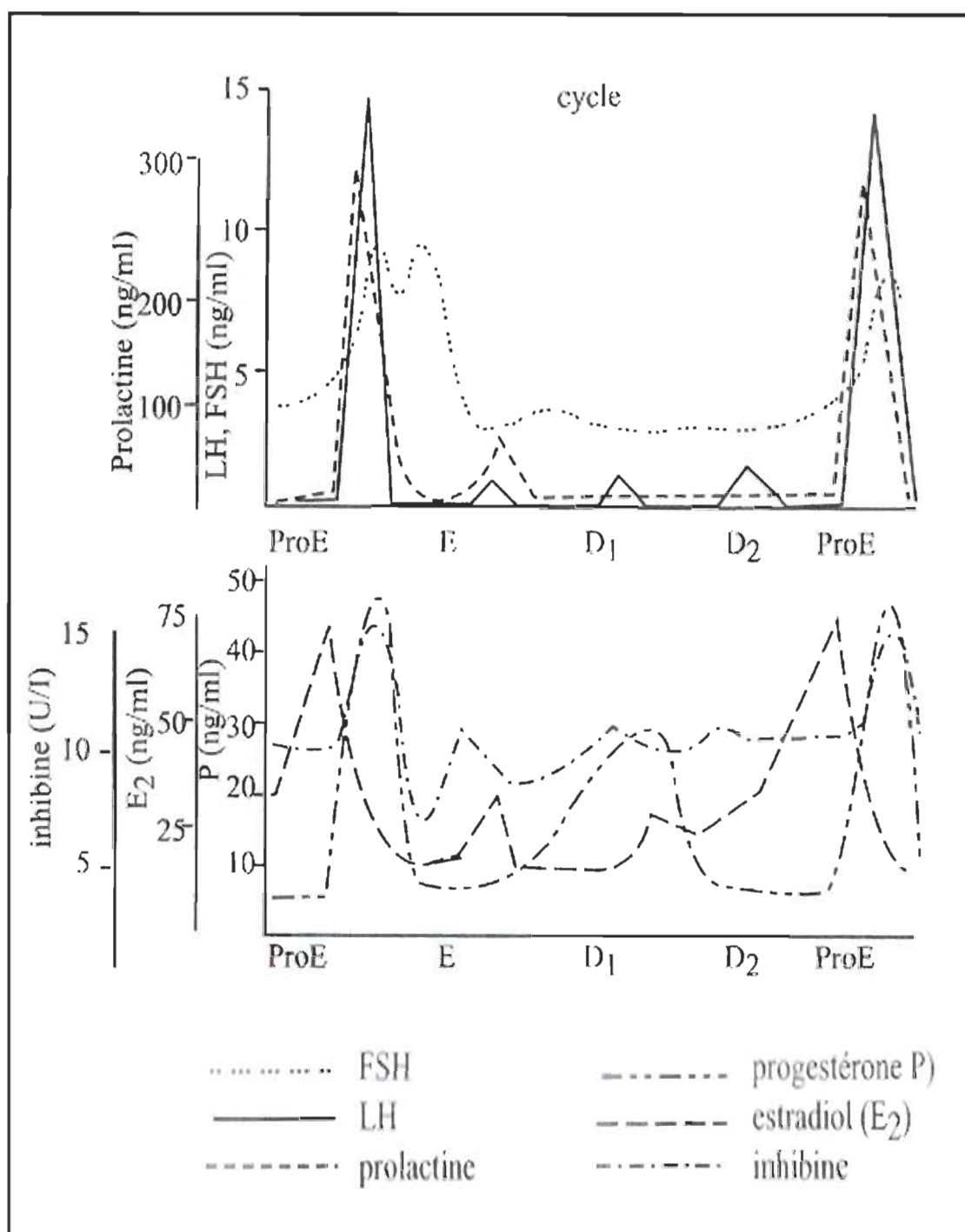


FIGURE 1.6 : Profils hormonaux chez la rate au cours du cycle oestral. La montée de la progestérone qui se produit dès le proestrus est responsable de l'apparition de l'estrus et joue un rôle important dans l'ovulation (Levasseur et al., 2001).

1.2 L'APOPTOSE ET LA SURVIE CELLULAIRE

L'apoptose est un mécanisme physiologique complexe de mort cellulaire permettant de contrôler le nombre de cellules dans un tissu ou un organe, sans provoquer de réponse inflammatoire.

Ce processus très régulé, est impliqué dans (a) le développement embryonnaire, (b) la croissance et (c) le maintien des tissus adultes normaux. Il permet également de débarrasser l'organisme des cellules qui menacent son intégrité, c'est-à-dire : (a) les cellules infectées, (b) mutées, (c) endommagées ou (d) âgées.

Dans les tissus adultes, les phénomènes de mitose (division cellulaire) et d'apoptose s'équilibrent, assurant ainsi un renouvellement cellulaire constant. Cet équilibre est préservé par un système compliqué de facteurs de croissance et de signaux de survie cellulaire contrebalancé par une panoplie d'inhibiteurs de croissance et de voies de signalisation de mort cellulaire programmée. L'apoptose peut être induit par la perte d'un signal (positif) de survie cellulaire ou par la réception d'un signal (négatif) apoptotique (Geske et al., 2001).

1.2.1 Bref historique

C'est en 1858, à l'Institut de Pathologie de Berlin, qu'un homme du nom de Rudolf Virchow (père de la pathologie moderne) écrit à ses collègues scientifiques, à propos de ses observations, « que les atteintes organiques et les maladies sont le résultat des altérations cellulaires individuelles ». Il note, en plus, l'observation d'un type de mort cellulaire spontanée très différente de la nécrose qu'il nommera « nécrobiose ». Ses travaux alors jugés sans importance sombrent dans l'oubli.

Il faudra attendre près d'un siècle, soit en 1951, avant que l'équipe d'André Glucksmann publie un article sur un type de mort cellulaire présent normalement lors du développement des vertébrés qu'il qualifiera de « dégénération cellulaire ».

Une étape importante est franchie en 1971-72, lorsque l'équipe de Kerr se penche sur le phénomène de mort cellulaire observée au cours d'une expérience et qui s'avère être très différente de la nécrose, le seul type de mort cellulaire connu à l'époque. Ils ont observé la formation des corps de Councilman ou corps apoptotiques (vacuoles contenant de la chromatine compactée et du cytoplasme), le bourgeonnement de la membrane plasmique et la phagocytose ou la dégradation des débris par les cellules environnantes. Ils ont alors suggéré que ce type de mort cellulaire, qu'ils nommèrent apoptose (terme grec, signifiant la chute des feuilles d'un arbre), était impliqué dans l'homéostasie des tissus parce qu'il ne provoquait pas de réponse inflammatoire.

Depuis ce jour, l'apoptose est devenu un des sujets les plus étudiés en sciences biologiques parce qu'il se retrouve dans toutes les variétés de cellules, de tissus et d'espèces, parce qu'il est induit par beaucoup de mécanismes différents et conséquemment impliqué dans beaucoup de pathologies tel que le cancer (Geske, et al., 2001).

1.2.2 Caractéristiques biochimiques et morphologiques

Très tôt, chez la cellule apoptotique, la condensation de la chromatine et du cytoplasme est observable. La diminution du volume cytoplasmique permet à la cellule de rompre ses jonctions cellulaires (desmosomes) avec les cellules voisines et/ou la membrane basale. Les organites cytoplasmiques, qui demeurent intacts au cours du processus (hormis les mitochondries), s'agrègent afin de faciliter leurs internalisations dans les vésicules formées par le bourgeonnement de la membrane plasmique (Gerschenson et al., 1992) (figure 1.7).

La condensation de la chromatine est rendue possible par les endonucléases qui sont activées, possiblement par la caspase-3 (Liu et al, 1997) et l'augmentation des niveaux intracellulaire de Ca^{2+} (McConkey et al., 1989) lors des processus apoptotiques, soient les ADNases I et II (Earnshaw, 1995). Plusieurs études ont démontré que la fragmentation de l'ADN produit d'abord de larges fragments (50 à 300 kb) puis des

fragments internucléosomales de 180 à 200 paires de bases qui caractérisent les dernières étapes de l'apoptose (Brown et al., 1993). Le noyau devient alors pycnotique et se fragmente parfois, l'enveloppe nucléaire disparaît.

La mitochondrie subit des transformations importantes et joue un rôle clé dans l'induction de l'apoptose. L'ouverture des pores de perméabilité de la mitochondrie provoque le gonflement de sa membrane par l'entrée massive des électrolytes et brise la chaîne de respiration cellulaire (diminution du potentiel membranaire et de la synthèse d'ATP) (Green et al., 1998). Lourdemment endommagée, la mitochondrie relargue des facteurs pro-apoptotiques et libère du Ca^{2+} intracellulaire (Liu et al., 1996).

Finalement, le phagocytage des corps apoptotiques contenant du cytoplasme, des organites et du matériel génétique fragmenté est facilité par l'externalisation de phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane de la cellule, ce qui a pour effet d'attirer spécifiquement les macrophages du système immunitaire (Fadok et al., 1992).

1.2.3 Apoptose versus nécrose

L'apoptose et la nécrose sont deux processus de mort cellulaire très différents (tableau 1). L'apoptose est un mécanisme ordonné, réversible jusqu'à un certain stade, régulé et programmé génétiquement, comparativement à la nécrose qui est chaotique, passive, sans aucune régulation et absolument irréversible.

Si un peu plus de 99,9 % des cellules de l'organisme meurent par apoptose (Datta et al., 1998), la nécrose constitue une mort subite qualifiée d'accidentelle, c'est-à-dire, une mort causée par des traumatismes (physiques, thermiques, chimiques) qui endommagent majoritairement la membrane plasmique et/ou les organites des cellules de façon irréversible. Le type de traumatisme concerné affecte souvent une région plus

TABLEAU 1.1

Différences générales entre l'apoptose et la nécrose.

| Characteristics | Apoptosis | Necrosis |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| Stimuli | Physiological | Pathological (injury) |
| Occurrence | Single cells | Groups of cells |
| Reversibility | No (after morphological changes) | Yes (up to the point of no return) |
| Adhesions between cells and to BM | Lost (early) | Lost (late) |
| Cytoplasmic organelles | Late stage swelling | Very early swelling |
| Lysosomal enzyme release | Absent | Present |
| Nucleus | Convolution of nuclear outline and breakdown (karyorrhexis) | Disappearance (karyolysis) |
| Nuclear chromatin | Compaction in uniformly dense masses | Clumping not sharply defined |
| DNA breakdown | Internucleosomal | Randomized |
| Cell | Formation of apoptotic bodies | Swelling and later disintegration |
| Phagocytosis by other cells | Present | Absent |
| Exudative inflammation | Absent | Present |
| Scar formation | Absent | Present |

*This table summarizes in broad terms the differences between apoptosis and necrosis. There are only a few exceptions to the general concepts presented in it.

Tiré de Gerschenson et al., 1992

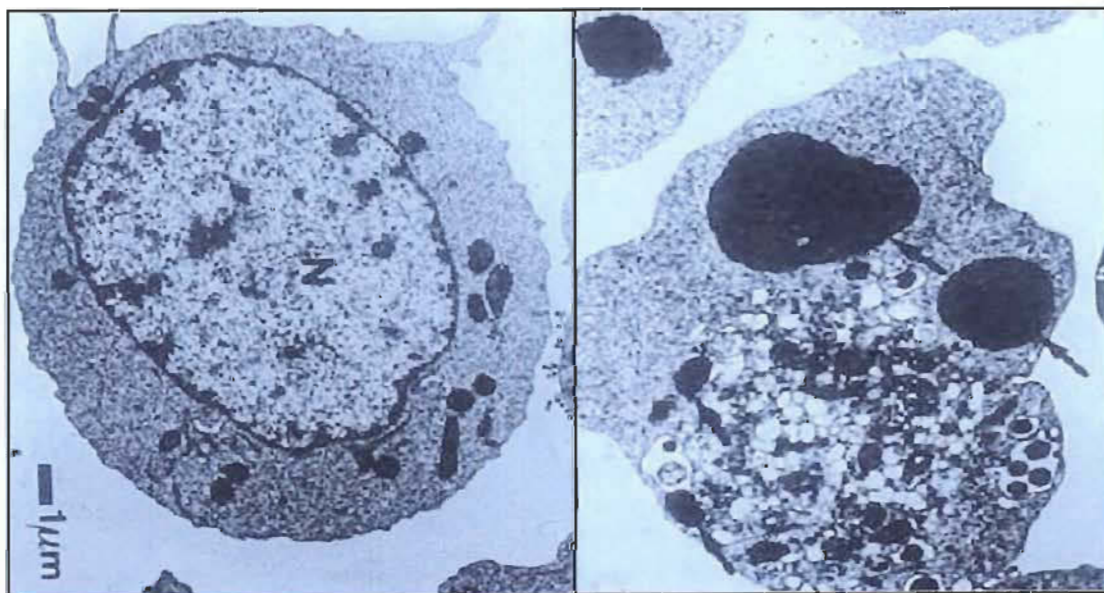


FIGURE 1.7 : Microscopie électronique d'une cellule normale à gauche et d'une cellule apoptotique à droite.

ou moins étendue de l'organisme, contrairement à l'apoptose qui cible une seule cellule (Gerschenson et al., 1992) (figure 1.8).

Lors de la nécrose, la cellule perd sa capacité à réguler sa pression osmotique à cause des nombreuses ruptures qui apparaissent à la surface de sa membrane, ce qui provoque son éclatement ou lyse. Tout le contenu cytoplasmique est endommagé et relâché dans l'environnement cellulaire, ce qui enclenche la réaction inflammatoire (Ibelgaft, 2003) et une réaction pathologique tissulaire impliquant les groupes de cellules avoisinantes (Amiesen, 1996).

1.3 PRÉSENTATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE PI 3-K/AKT

Récemment, l'habileté des différents facteurs ou stimuli extracellulaires à promouvoir la survie cellulaire et inhiber l'apoptose a été attribué, au moins en partie, à la cascade ou voie de signalisation de la phosphatidylinositide 3'OH kinase /c-Akt (PI 3-K/Akt) (Yao et al., 1995).

Les effecteurs dans cette voie de signalisation sont nombreux : certains sont anti-apoptotiques, d'autres apoptotiques. Les mécanismes et interactions entre eux ne sont pas toujours clairement établis et compris.

Dans les prochaines sections, la présentation des différentes protéines constituant la voie de signalisation de PI 3-K/Akt et leurs interactions se limitera à celles étudiées dans le cadre de ce projet de recherche (figure 1.9).

1.3.1 La Phosphatidylinositide 3' OH kinase (PI 3-K)

Les signaux ou stimuli de survie cellulaire (facteurs de croissance, cytokines) activent les voies de signalisations internes de la cellule soit : (a) en se liant aux récepteurs membranaires, dont certaines possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (Segal et al., 1996), (b) en se couplant indirectement à une tyrosine kinase (Clark et al., 1995)

Nécrose

Apoptose

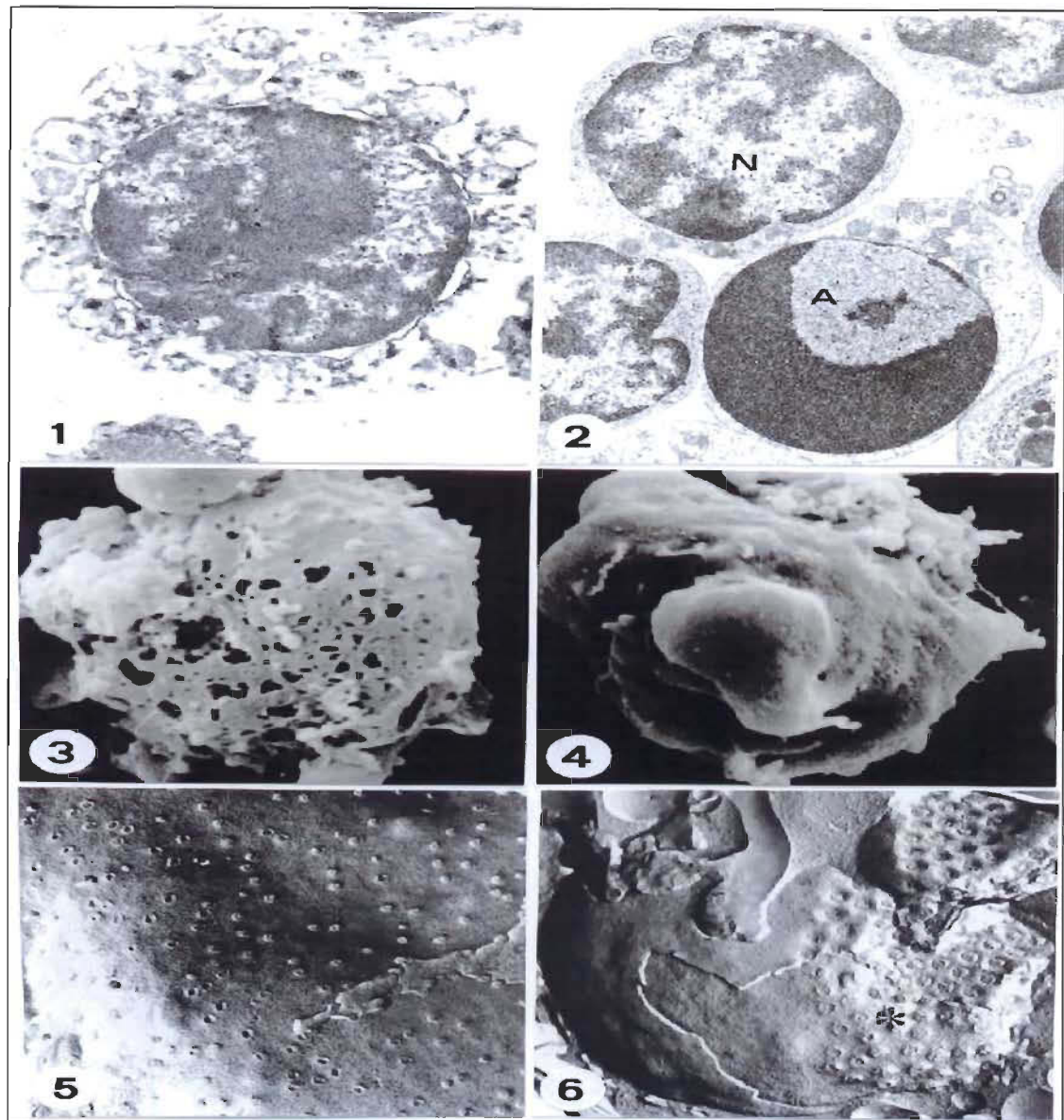


Figure 1.8 : Différences microscopiques entre la nécrose et l'apoptose. Lors de la nécrose, en 1) la rupture de la membrane plasmique et des organites est observable, 3) de nombreuses lésions apparaissent à la surface de la cellule et on constate en 5) la distribution régulière des pores nucléaires. Comparativement, chez une cellule apoptotique, 2) le réarrangement de la chromatine apparaît en A, très différent d'une organisation normale (N), 4) le bourgeonnement de la membrane est évident et 6) l'enveloppe nucléaire montre des amas de pores (astérisques) (Schimke, 1993).

ou (c) en s'associant à un récepteur membranaire à protéine G (Weiner et al., 1999). L'activation de ces récepteurs induit le recrutement de PI 3-K qui agit comme précurseur de seconds messagers (Wymann et al., 1998). Les phosphatidylinositides 3' OH kinases sont accolées sous la surface interne de la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire.

Le rôle de PI 3-K consiste à catalyser le transfert du groupe phosphate γ de l'ATP (adénosine triphosphate) à la position D3 ou R3 d'un phosphoinositide (Hinchliffe et al., 1997). PI 3-K est un hétérodimère d'environ 200 kDa, composé d'une sous-unité régulatrice de 50-100 kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110-120 kDa (p110), capable de phosphoryler *in vitro* PtdIns, PtdIns 4-P et PtdIns(4,5)P₂. Toutefois, cette classe de PI 3-K semble avoir une préférence pour le substrat PtdIns (4,5) P₂ *in vivo* (Stephens et al., 1991) (figure 1.10).

La conversion de PtdIns (4,5)P₂ en PtdIns(3,4,5)P₃ a pour cible l'activation et la phosphorylation de la protéine sérine/thréonine kinase Akt via les phosphoinositides-kinases dépendantes (PDKs). PDK de type 1 phosphoryle la thréonine³⁰⁸ (Alessi, James et al., 1997), tandis que PDK de type 2 phosphoryle indépendamment la sérine⁴⁷³ de Akt/PKB (Delcommenne et al., 1998).

Les inhibiteurs de PI 3-K sont la wortmannin, tirée d'une moisissure du nom de *Penicillium fumiculosus*, qui inhibe l'activité de PI 3-K en se liant à la lysine⁸⁰² de la sous-unité p110 (Arcaro et al., 1993), tandis que LY294002 (quercetin-derived PI 3-K inhibitor) a pour cible les sites de liaisons de l'ATP (Vlahos et al., 1994).

1.3.2 La protéine Akt/PKB/RAC

Accordant l'importance de PI 3-K comme médiateur des signaux de survie cellulaire, de récentes études suggèrent que l'activité de Akt est suffisante pour bloquer l'apoptose induit par les stimuli apoptotiques (Yao et al., 1995).

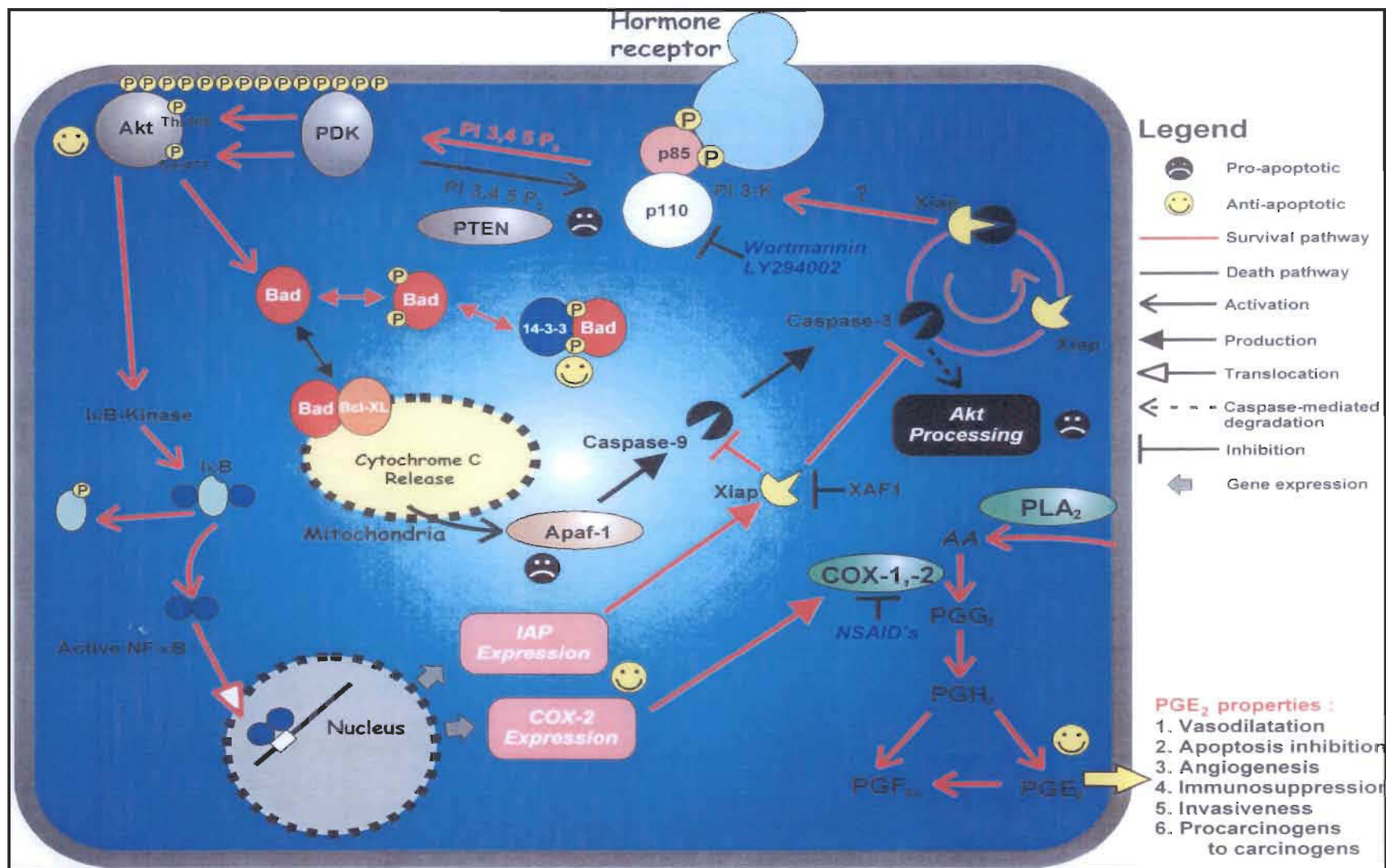


FIGURE 1.9 : Schématisation simplifiée de la voie de signalisation de PI 3-K/AKT.

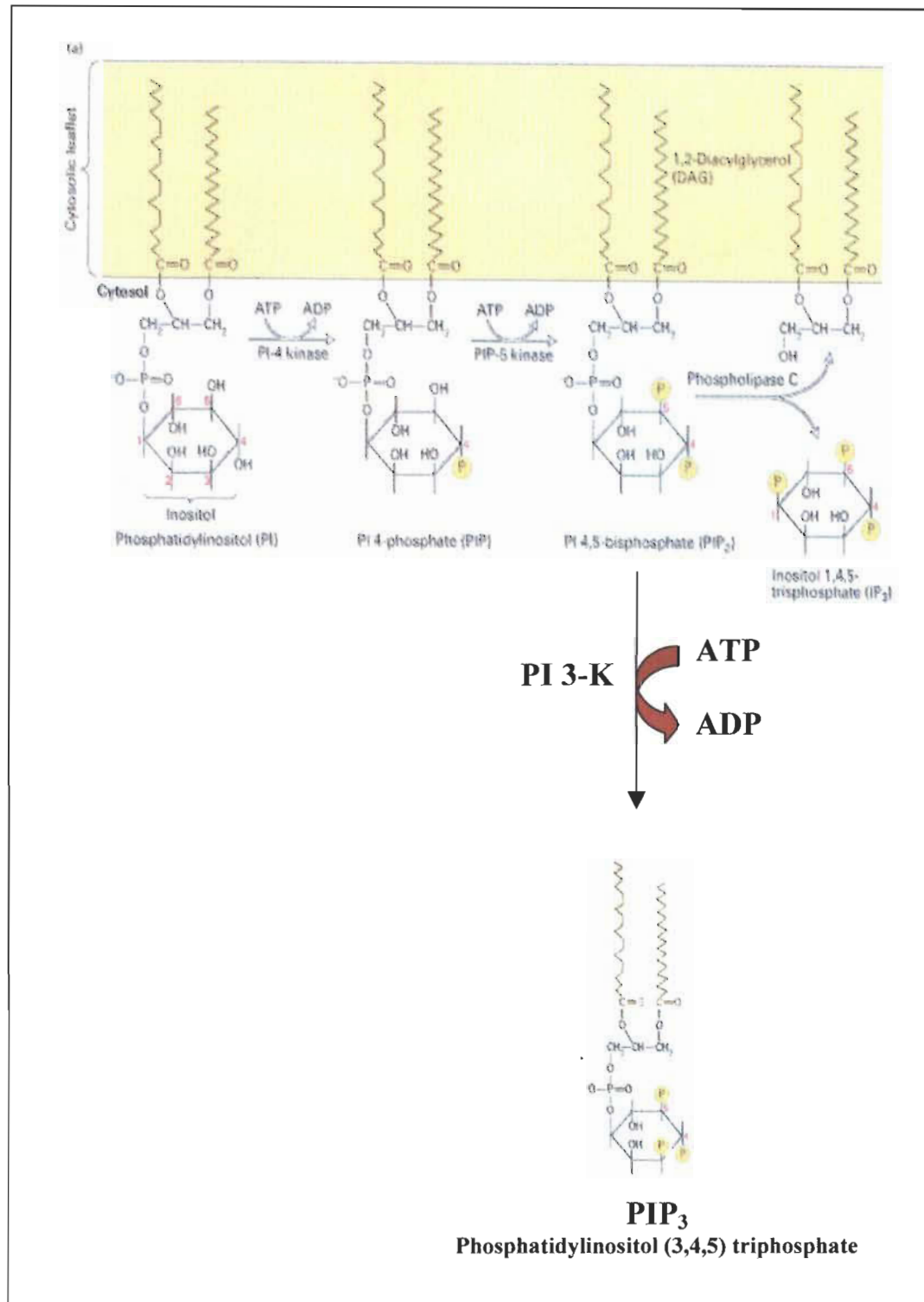


FIGURE 1.10 : Les voies de conversions des phosphoinositides. Les phosphoinositides sont présent au niveau de la membrane plasmique, différentes enzymes assurent leurs conversions en seconds messagers (DAG, IP₃ et PIP₃).

Akt est l'homologue cellulaire du « transforming oncogene » du rétrovirus AKT8 (Staal, 1987). Les analyses moléculaires révèlent qu'Akt résulte de la recombinaison entre la séquence virale *gag* et le gène cellulaire Akt. Il existe trois isoformes de Akt soit : Akt1, Akt2 et Akt3, qui ont un peu plus de 90% d'homologie (Datta et al., 1999) mais sont exprimés différemment tant au niveau de leur ARNm qu'au niveau des protéines (Bellacosa et al., 1993). La famille des protéines Akt contient un domaine kinase central qui a une spécificité pour les résidus sérines ou thréonines dans les substrats protéiques. Le côté N-terminal de Akt inclus un domaine PH (pleckstrin homology) qui sert d'intermédiaire dans les interactions lipide-protéine et/ou protéine-protéine. Le côté C-terminal présente un domaine hydrophobe et riche en prolines (Musacchio et al., 1993).

Akt /PKB/RAC (Activated by Kinase Tyrosine / Protein B Kinase / Related to A and C protein kinase) est une protéine de 60 kDa qui se lie directement à PtdIns(4,5)P₂ à l'aide de son domaine PH (Klippel et al., 1997). Cette liaison provoque uniquement la translocation de Akt du cytoplasme vers la surface interne de la membrane plasmique (Andjelkovic et al., 1997). La relocalisation de Akt lui permet d'être à proximité des kinases régulatrices importantes pour son activation et sa phosphorylation (Kohn et al., 1996).

Alessi et ses collègues (Alessi et al., 1996), identifièrent quatre sites de phosphorylations *in vivo* sur Akt, dont deux semblaient être phosphorylés constamment. L'activité kinase de Akt est déterminée, en partie, par la phosphorylation de sa sérine⁴⁷³ et de sa thréonine³⁰⁸ par les PDKs. Akt doit subir un changement de conformation induit par la liaison de PIP₃ sur son domaine PH afin de rendre ses sites de phosphorylations accessibles aux PDKs (Curie et al., 1999). Apparemment, la régulation de Akt impliquerait plusieurs mécanismes, non-résolus, en lien avec les phospholipides générés par PI 3-K.

L'une des composantes de la machinerie apoptotique inhibée par Akt est BAD, un membre de la famille des Bcl-2, qui enclenche le processus apoptotique en provoquant

l'ouverture des pores de perméabilité de la mitochondrie. Akt inactive également la caspase-9, élément clé dans l'activation de la cascade des caspases. De plus, Akt libère NF- κ B, un facteur nucléaire de transcription et de régulation de la famille des Bcl-2 et des inhibiteurs des caspases (IAPs), normalement séquestré dans le cytoplasme.

1.3.3 La protéine PTEN/MMAC

PTEN/MMAC (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten / mutated in multiple advanced cancers) qui a été identifié pour la première en 1997, par trois équipes différentes, est une protéine de 54 kDa présentant une activité phosphatase capable de déphosphoryler les phosphotyrosines, phosphosérines et/ou phosphothréonines (Myers et al., 1998).

La fonction de PTEN, *in vivo*, est de réguler la voie de signalisation de PI 3-K/Akt en empêchant l'activation et la phosphorylation de Akt via PIP₃. L'équipe de Maehama (Maehama et al., 1998) a réussi à démontrer que PTEN déphosphorylait la position 3 des PtdIns, *in vivo* et *in vitro*, et transformait par la suite PIP₃ en un substrat pouvant être recyclé par PI 3-K. Ceci confirme que PTEN a une activité phosphatase à double spécificité, c'est-à-dire, capable de déphosphoryler les protéines et les lipides.

L'expression de PTEN empêche également l'activation systématique de Akt, c'est-à-dire l'activation en l'absence de facteurs ou stimuli (Myers et al., 1998). Un lien est maintenant établi entre la dérégularisation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt et les cancers chez l'humain via les anomalies ou déficiences de PTEN (Wu et al., 1998). Normalement, l'activation de Akt est minimale en l'absence de stimulation. Cependant, dans les lignées cancéreuses déficientes en PTEN, le taux de phosphorylation de Akt est extrêmement élevé (Gagnon et al., 2003).

La région C-terminale de PTEN contient un domaine C2 qui a été identifié chez les protéines impliquées dans la transduction de signaux et localisées au niveau des membranes (Rizo et al., 1998). Ce domaine démontre de l'affinité, *in vitro*, pour les

membranes phospholipidiques. La région terminale contient aussi un site de liaison PDZ, important dans les interactions protéine-protéine (Fanning et al., 1999), et un domaine PEST qui régule la stabilité de la protéine (Georgescu et al., 1999). La queue de la région contient plusieurs sites de phosphorylation localisés dans les 50 derniers acides aminés. Cette section, même si elle s'avère inutile pour l'activité phosphatase est critique pour la stabilité protéique. Les mutations dans ce site réduisent drastiquement la demi-vie de PTEN et sa quantité (Vasquez et al., 2000). La demi-vie normale de PTEN est relativement longue de deux heures (Georgescu et al., 1999). Torres et Pulido (2001) ont démontré que la protéine kinase CK2 phosphoryle, *in vivo*, PTEN sur les sérines ^{370, 380, 385} et sur la thréonine ³⁸³. PTEN déphosphorylé est rapidement dégradé. Environ 43 % des mutations surviennent dans la région C-terminale de la protéine (Lee et al., 1999).

La région N-terminale contient la section enzymatique de PTEN, c'est-à-dire son domaine phosphatase. La majorité des mutations surviennent à l'intérieur de ce domaine. Le site actif du domaine phosphatase de PTEN est beaucoup plus large que celui des autres phosphatases connues, ce qui permettrait une meilleure accessibilité pour les substrats lipidiques (Lee et al., 1999).

1.3.4 Les protéines BCL-2, BCL-XL, BAD, BID et BAX

BCL-2 (B cell lymphomas-2) est une grande famille de protéines qui possèdent une structure relativement commune c'est-à-dire, quatre domaines BCL-2 homologues (BH) désignés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Adams et al., 1998). La famille BCL-2 peut se diviser en deux catégories selon la capacité d'induire ou d'inhiber l'apoptose : les pro-apoptotiques (BAD, BAX) ou les anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X_L). Elle peut aussi se diviser en trois catégories selon les domaines : la sous-famille de BCL-2 (BCL-2, BCL-X_L) qui possèdent les domaines BH1 à BH4, la sous-famille de BAX constituée par les domaines BH1 à BH3 et la sous-famille BH3 formée par ce seul domaine (BAD, BID). La plupart des protéines de la grande famille de BCL-2 contiennent un domaine C-terminal hydrophobe qui se révèle nécessaire pour être capable de cibler les

membranes lipidiques comme celle de la mitochondrie, plus particulièrement (Nguyen et al., 1993).

Les protéines anti-apoptotiques sont localisées au niveau des membranes de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et/ou de l'enveloppe nucléaire, elles sont donc considérées comme des protéines membranaires intégrales (Zhu et al., 1996). La fraction de protéines pro-apoptotiques se retrouve par contre au niveau du cytoplasme ou du cytosquelette. Suivant la réception d'un signal apoptotique, les protéines de cette catégorie subissent un changement de conformation qui leur permet de cibler et de s'intégrer dans les membranes, spécialement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Gross et al., 1998).

L'activité biologique des protéines de la famille BCL-2 est tributaire de leur capacité à s'intégrer dans les membranes et de leur habileté à former des homo ou des hétérodimères. C'est la balance entre ces deux types de dimères qui détermine la survie ou la mort cellulaire (Green, 1998).

BAD (BCL-X_L/BCL-2-associated death promoter) fait partie de la sous-famille BH3. BAD est la première composante du processus apoptotique à être phosphorylé par Akt (Yang et al., 1997). Sa fonction est modulée par la phosphorylation de sa sérine¹¹² mais principalement par sa sérine¹³⁶ (Gajewski et al., 1996). En l'absence de phosphorylation, BAD induit l'apoptose en migrant et s'intégrant à la membrane mitochondriale pour former un hétérodimère avec BCL-X_L de préférence ou avec BCL-2 via son domaine BH3 (Yang et al., 1997). La phosphorylation de ces 2 sites par Akt, provoque la dissociation de l'hétérodimère BAD/BCL-X_L et BAD s'associe instantanément avec la protéine 14-3-3. Cette protéine cytosolique empêche la déphosphorylation de BAD et le séquestre en le maintenant à l'écart de sa cible mitochondriale (Muslin et al., 1996).

BAX est une protéine pro-apoptotique qui se retrouve principalement sous la forme d'un monomère dans le cytoplasme ou faiblement attachée à une membrane. Après la

réception d'un signal de mort cellulaire, BAX s'intègre dans la membrane mitochondriale comme un homodimère (Gross et al., 1998) et forme un canal ionique (Antonsson et al., 1997) ce qui contribue à accélérer la déstabilisation de la membrane mitochondriale. BCL-2 et BCL-X_L ont la capacité d'inhiber BAX en formant un hétérodimère avec lui (Oltvai et al., 1993).

La membrane mitochondriale perd son potentiel membranaire et sa capacité à réguler sa pression osmotique suite aux canaux ioniques formés par BAX. Il y a arrêt de la synthèse d'ATP et libération de plusieurs facteurs inducteurs de l'apoptose : relargage du cytochrome c (Liu et al., 1996), de l'AIF (apoptosis inducing factor) (Kroemer et al., 1997), de Smac/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspase) (Du et al., 2000), de Ca²⁺ et de l'endonucléase G (Li et al., 2001).

L'augmentation de la concentration du cytochrome c dans le cytoplasme entraîne la formation du complexe multiprotéique connu sous le nom d'apoptosome (Tsujimoto, 1998). Ce dernier est formé de Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), de cytochrome c, d'ATP et de la procaspase-9. Le cytochrome c se lie à l'Apaf-1, libérant une inhibition intramoléculaire et facilitant les interactions entre Apaf-1 et la procaspase-9. Cette interaction enclenche l'activité protéolytique de la caspase-9. En plus de la caspase-9, qui entraîne le clivage et l'activation des procaspases, le cytochrome c est nécessaire pour l'activation de six autres caspases : 2,3,6,7,8,10 (Slee et al., 1999). Les caspases interviennent dans le clivage d'une panoplie de substrats cellulaires (Cryns et al., 1998) (Voir point 1.3.5).

AIF est une protéine d'environ 50 kDa qui induit l'apoptose en activant les endonucléases nécessaire pour la fragmentation de l'ADN (Kroemer et al., 1997). De même, l'endonucléase G fragmente la chromatine indépendamment des caspases (Li et al., 2001). Smac/DIABLO est un inhibiteur de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis). Cette protéine favorise donc l'activation des caspases.

En plus de la capacité de la famille de BCL-2 de réguler indirectement l'apoptosome par le contrôle exercé sur la libération du cytochrome c, BCL-X_L peut se lier directement à Apaf-1 et bloquer l'activation de la procaspase-9 (Dragovich et al., 1998). L'inhibition est levée par BAX qui facilite, en plus, la libération de Smac/DIABLO (Deng et al., 2002).

1.3.5 Les caspases

Les caspases (cysteine aspartic acid-specific proteases) (Alnemri et al., 1996), au nombre de quatorze, sont une famille de protéases qui partagent des caractéristiques communes : (a) les caspases sont présentes dans les cellules sous forme latentes ou inactives et forment des homodimères à la suite de leur activation, (b) elles sont clivées en des sous-unités soit par autoprotéolyse ou par une autre caspase, (c) elles clivent du côté C-terminale à un résidu aspartate de substrats contenant le motif Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) (Garcia et al., 1999).

Les caspases peuvent être classées en sous-groupes : les caspases 8, 9, 10 et possiblement 2 et 5 peuvent enclencher la cascade d'activation des caspases et font partie des initiateurs du sous-groupe. La caspase-9 peut s'activer par dimérisation (Stennicke et al., 1999) et la caspase-8 par dimérisation avec autoprotéolyse (Ashkenazi et al., 1998). Les effecteurs du sous-groupe sont les caspases 3, 6 et 7 qui propagent la cascade et sont activées par le clivage protéolytique des autres caspases (Slee et al., 1999). Normalement, les initiateurs ont un long prédomaine et les effecteurs, un court. Un deuxième sous-groupe de caspases est impliqué dans le traitement des cytokines et se compose des caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14. À ce jour, plus de soixante substrats sont clivés par les caspases incluant des protéines impliquées dans la machinerie de réparation de l'ADN cellulaire (Stroh et al., 1998).

Les caspases sont constituées d'une pro-région d'acides aminés qui sépare la caspase en une large sous-unité du côté N-terminal et d'une petite sous-unité du côté carboxyl. La maturation des caspases implique la formation d'un homodimère et du processus

protéolytique. La plupart des caspases ont deux sites potentiels de clivages à la jonction des deux sous-unités. Ces sites sont séparés par quelques acides aminés seulement et peuvent être clivés mutuellement. La caspase active est composée de deux larges sous-unités d'environ 20 kDa et de deux petites sous-unités de 10 kDa, approximativement. Les deux sous-unités sont requises pour la liaison et l'activité catalytique. Le site actif de la cystéine qui forme un lien covalent avec le substrat est localisé près de l'extrémité carboxyl de la large sous-unité (Mittl et al., 1997).

L'activité des caspases est régulée par la dimérisation. Les pro-régions de certaines caspases facilitent la dimérisation en interagissant avec des protéines adaptatrices contenant un domaine de recrutement des caspases (CARDs) ou avec un domaine effecteur de mort cellulaire (DED) favorisant la formation d'un complexe induisant l'apoptose, avec la caspase-8 ou la caspase-10. Ce complexe peut être inhibé par d'autres protéines contenant un domaine DED. Cela peut expliquer pourquoi on retrouve les DEDs aussi bien sur des protéines pro-apoptotiques que sur des protéines anti-apoptotiques (Tibbets et al., 2003). Les caspases sont dégradées durant l'apoptose.

Akt peut bloquer le processus apoptotique même après la libération du cytochrome c mitochondriale en phosphorylant la sérine¹⁹⁶ de la caspase-9, ce qui inactive son activité catalytique intrinsèque (Cardone et al., 1998). Toutefois, Akt n'est pas considéré comme un inhibiteur général des caspases. C'est les membres de la famille des IAPs qui inhibent directement l'activité des caspases 3, 7 et 9 (Devereaux et al., 1997)

1.3.6 La protéine XIAP

Les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) constituent une famille de protéines intracellulaires anti-apoptotiques qui ont été identifiés en premier lieu comme des analogues de gènes présents dans les baculovirus. Sept IAPs humains ont été découverts jusqu'à présent : XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NAIP (neuronal apoptosis

inhibitory protein) (Liston et al., 1996), Survivin (Ambrosini et al., 1997), Bruce (Hauser et al., 1998) et Livin/ML-IAP1 (Kasof et al., 2001).

Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis protein), est une protéine de 53 kDa qui est exprimée ubiquitairement dans les tissus normaux (Farahani et al., 1997). Xiap contient deux types de séquences aux motifs conservés : les BIRs (baculovirus IAP repeats) et le « zinc finger-like Ring finger ». Les BIRs sont localisés du côté N-terminal et Xiap en contient trois : BIR1, BIR2 et BIR3 (Sun et al., 2000). À la surface des domaines BIRs, un nombre important de régions hydrophobes et de domaines d'acides aminés chargés ont été identifiés, lesquels pourraient participer aux interactions entre les IAPs et autres protéines. Quant au « Ring finger » présent à l'extrémité COOH-terminale, il possède une activité ligase qui régule directement la dégradation de Xiap par les protéasomes (Yang et al., 2000) sous l'effet d'un stimulus pro-apoptotique. Les c-IAP1 et c-IAP2 possèdent en plus un domaine de recrutement des caspases (CARDs).

Xiap est généralement localisée au niveau du cytoplasme et démontre la faculté de bloquer spécifiquement l'activation des caspases 3, 7 et 9. Dans les cellules humaines, Xiap peut être elle-même clivée par les caspases (Devereaux et al., 1999). Les deux fragments clivés demeurent capables d'inhiber l'activité des caspases. Le clivage survient dans la région séparant BIR2 et BIR3 et correspond aux sites de liaisons spécifiques de Xiap. BIR2 s'associe aux caspases 3 et 7 (Takahashi et al., 1998) pendant que BIR3 se lie à la caspase-9 (Sen et al., 2000).

L'expression des IAPs est dépendante de l'activation de NF- κ B, transcripteur régulé par Akt. Lorsqu'Akt phosphoryle la protéine I κ B, cette dernière libère le facteur de transcription NF- κ B qu'elle séquestre. Ce dernier se dirige au niveau du noyau pour activer la transcription des gènes des IAPs et de d'autres protéines favorisant la survie cellulaire. (Voir point 1.3.8)

Xiap, par contre, est inhibée par la protéine Smac/DIABLO et XAF-1. Les acides aminés terminaux de DIABLO et la sous-unité p¹⁰ de la caspase-9 activée sont très

similaires et se font la compétition afin de se lier aux sites de BIR3 de Xiap (Liu et al., 2000). Les interactions de DIABLO et caspase-9 avec Xiap sont mutuellement exclusives. Le même processus survient pour les caspases 3 et 7 au niveau de BIR2 de Xiap. DIABLO est une protéine dimérique qui interagit avec les BIRs domaines de Xiap mais avec une plus forte affinité pour le BIR3 (Chai et al., 2000).

XAF-1 (XIAP-associated factor 1) est une protéine nucléaire qui interagit directement avec la protéine XIAP en la séquestrant dans des inclusions nucléaires et favorise ainsi l'activation de la cascade des caspases (Liston et al., 2001). XAF-1 est exprimé ubiquitairement dans les tissus mais est présent à des niveaux très faibles dans plusieurs lignées cancéreuses.

1.3.7 Les protéines IκB, sa forme phosphorylée (P-IκB) et NF-κB

NF-κB (nuclear factor kappa B) est un facteur de transcription hétérodimérique, au centre des régulations des processus inflammatoires et immunitaires en contrôlant l'expression géniques (a) de cytokines, (b) de chemokines, (c) de immunorécepteurs, (d) de protéines présentatrices d'antigènes, (e) de facteurs de croissance, (f) de facteurs de transcriptions, (g) de molécules d'adhésions cellulaires, (h) de protéines du stress et (i) de régulateurs apoptotiques (les IAPs entre autres) (Pahl, 1999). Toutes les protéines de la famille des Rel/NF-κB ont un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé et de dimérisation nommé RHD (Rel homology domain). Ils peuvent former des homo ou hétérodimères en se liant au site κB de dix paires de bases sur le promoteur des gènes ciblés (May et al., 1997). Le type d'hétérodimère le plus commun est celui formé de p50/p65. C'est la sous-unité p65 qui est responsable de la capacité de NF-κB de stimuler la transcription. La sous-unité p50 permet la liaison à l'ADN (Ballard et al., 1992).

L'activité de NF-κB est régulée par sa translocation nucléaire. L'hétérodimère p50/p65 existe dans le cytoplasme sous sa forme inactive associé à la protéine inhibitrice IκB (May et al., 1997). Akt induit la phosphorylation de deux sérines N-terminales

spécifiques sur I κ B- α par le complexe kinase I κ K qui comprend I κ K α , I κ K β et I κ K γ (Brown et al., 1995). La phosphorylation d'I κ K α entraîne sa dégradation par le protéasome 26S (DiDonato et al., 1995) permettant à NF- κ B de se libérer et d'entrer rapidement au niveau du noyau. À cet endroit, NF- κ B se lie sur le site κ B de son promoteur et active la transcription des gènes. La localisation de NF- κ B est régulée par l'acétylation de sa sous-unité p65. Si cette dernière est acétylée cela prévient la liaison avec le transporteur I κ B- α pendant que la dé-acétylation permet une liaison efficace avec le transporteur nucléaire (Chen et al., 2001).

L'habileté de NF- κ B de lier l'ADN et d'activer la transcription est contrôlée par la phosphorylation de la sérine²⁷⁶ de la sous-unité p65. La phosphorylation de la sérine⁵²⁹ et de la sérine⁵³⁶ de la même sous-unité amplifie le potentiel de transactivation de NF- κ B (Wang et al., 2000). La phosphorylation de la sous-unité p50 régule la liaison de NF- κ B avec l'ADN. La sous-unité est phosphorylée en ordre décroissant d'importance sur les sérines, les thréonines mais pas sur les tyrosines (Hayashi et al., 1993) et une hypophosphorylation entraîne une incapacité de NF- κ B de se fixer sur l'ADN ce qui constitue dans les faits un mécanisme de régulation. L'équipe de Hou (Hou et al., 2003) a démontré que seul la phosphorylation de la sérine³³⁷ sur la sous-unité p50 était essentielle à la liaison de l'ADN par NF- κ B.

Les homodimères formés par p50/p50 occupent les mêmes sites de liaisons que celui de NF- κ B p50/p65, cependant ils agissent comme agents répresseurs de la transcription des promoteurs de NF- κ B.

1.4 OBJECTIFS

Les mécanismes apoptotiques jouent un rôle essentiel lors de l'implantation embryonnaire. À ce moment, les cellules épithéliales de l'endomètre utérin meurent par apoptose (mort cellulaire programmée) afin de permettre à l'embryon de s'implanter adéquatement en libérant l'espace nécessaire à sa prolifération. Toute altération de ce processus entraîne des complications voir l'arrêt de la gestation et peut être impliqué

dans les problèmes d'infertilité féminine. L'objectif de ce travail est d'étudier l'implication de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt dans la régulation de l'apoptose de l'utérus durant le cycle oestral chez le rat et de déterminer si l'apoptose peut être régulé par les hormones sexuelles via l'activation de Akt.

CHAPITRE 2
REGULATION OF AKT EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION BY 17 β -
ESTRADIOL IN THE RAT UTERUS DURING ESTROUS CYCLE

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre II (publié dans la revue *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003; 1 : 47 (13 pages)) sont : Marie-Claude Déry (fait les expériences en relation avec les jours du cycle, écriture de l'abstract, matériel et méthodes, figures), Valérie Leblanc (fait les expériences en relation avec le 17β -estradiol, figures), Carl Shooner (fait les ovariectomies) et Éric Asselin, directeur de recherche (écriture et correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Les mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation des processus apoptotiques dans les cellules endométriales sont quasi inconnus et peu documentés. Nous avons émis l'hypothèse que la voie de survie cellulaire de Akt pouvait être impliquée dans la régulation de l'apoptose au niveau de l'utérus durant le cycle oestral. Les rates avec un cycle oestral régulier de quatre jours ont été euthanasiées à différents jours du cycle (diestrus, proestrus, estrus, metestrus). Les utérus ont été prélevés et fixés pour l'immunohistochimie (IHC) et/ou pour la détection des cellules apoptotiques par la technique TUNEL ou les protéines ont été extraites de l'endomètre pour des analyses de type Western Blot. Les analyses du TUNEL nous révèlent que l'apoptose est principalement retrouvée en estrus comparativement aux autres jours du cycle et au niveau des cellules épithéliales luminales seulement. Aucune cellule apoptotique n'est présente en proestrus. Par contraste, la prolifération atteint son maximum en proestrus comme le confirme le marqueur nucléaire de prolifération CDC47/MCM7. L'expression de la forme intacte de la caspase-3 est maximale en proestrus et diminue seulement en estrus. Dans le même ordre d'idée, le fragment de la caspase-3 clivée se retrouve en estrus uniquement et l'IHC révèle que le signal de la caspase-3 clivée est visible au niveau des cellules épithéliales luminales. La protéine PTEN, une phosphatase impliquée dans la régulation de la phosphorylation de Akt, est présente à tous les jours du cycle et ne présente aucune régulation significative en relation avec le cycle. L'expression de phospho-Akt, la forme activée de Akt est présente en métrus, diestrus et proestrus mais diminue drastiquement en estrus alors que l'expression de Akt est maximale à cette phase. L'IHC révèle que l'expression de Akt est élevée en estrus dans les cellules épithéliales et stromales. Nos investigations utilisant des rates ovariectomisées ont démontré que le 17 β -estradiol stimule la prolifération des cellules endométriales qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de Akt. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression et de l'activité de Akt en réponse au 17 β -estradiol pourrait être un mécanisme important pour protéger les cellules endométriales de l'apoptose et pour

induire la prolifération cellulaire alors que l'inhibition de l'activité de Akt conduit à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose dans les cellules endométriales.

REGULATION OF AKT EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION BY 17 β -ESTRADIOL IN THE RAT UTERUS DURING ESTROUS CYCLE[†]

Marie-Claude Dery, Valerie Leblanc, Carl Shooner and Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Section Biologie Médicale, Université du Québec à
Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: Apoptosis in the rat uterus during estrous cycle.

Key words: Akt, PTEN, Caspases, apoptosis, rat, estrus, uterus.

*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Département de Chimie-Biologie
Section Biologie Médicale
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric_Asselin@uqtr.ca

[†] This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a chercheur-boursier from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

ABSTRACT

Molecular and intra-cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis processes in endometrial cells are poorly understood and documented. We have investigated the possibility that Akt survival pathway might be involved in the regulation of apoptosis in the uterus during the estrous cycle. Rats with regular estrous cycle (4 days) were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling (TUNEL) or endometrial protein extracts collected for Western analysis. TUNEL analysis revealed that apoptosis was mainly found at estrus compared to other day of estrous cycle. TUNEL positive cells were apparent in luminal epithelial cells only. No apoptotic cells were observed at proestrus. In contrast, proliferation was maximal at proestrus as confirmed with the expression of CDC47/MCM7 (a cell proliferation marker). Intact form of caspase-3 was maximal at proestrus and was reduced only at estrus. Likewise, presence of a specific cleaved caspase-3 fragment was observed only at estrus and IHC revealed that cleaved caspase-3 signal was found in luminal epithelial cells. PTEN protein, a phosphatase involved in the regulation of Akt phosphorylation, was present at all days of estrous cycle and showed no significant regulation in relation to cycle. Expression of phospho-Akt (the activated form of Akt) was present at metestrus, diestrus, and proestrus but decreased significantly at estrus. Akt protein expression was maximal at estrus. IHC revealed that Akt expression was high in both stromal and epithelial cells at estrus. Further studies using ovariectomized rats demonstrated that 17 β -estradiol increased endometrial cell proliferation which was accompanied by an increase of both Akt expression and phosphorylation. These results suggest that increased Akt expression and activity in response to estradiol may be an important mechanism to protect endometrial cells from apoptotic triggering and to induce endometrial cell proliferation, whereas inhibition of Akt activity leads to caspase-3 activation and apoptosis in endometrial cells.

INTRODUCTION

Apoptosis is a mechanism by which uterine luminal epithelium and glands degenerate in the absence of embryonic factors and regenerate in a cycling fashion through the estrous cycle. Sex steroids (estrogen and progesterone) are directly responsible for the histological and morphological changes in the uterus during estrous cycle. Studies have shown highest apoptosis expression in lining epithelium at estrus in mouse [1] and rat [2,3]. Other studies have shown that estrogen induces uterine epithelial cell proliferation and estrogen withdrawal results in cell death [4-6]. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus. Since menses are absent in rodents as compared to humans and primates, there must be important mechanisms controlling the balance between survival and death factors in order to maintain integrity of endometrium throughout the estrous cycle, particularly following estrogen-induced proliferation and absence of embryonic signal.

Akt, a serine/threonine protein kinase also known as PKB, is activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [7-9] through phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Once phosphorylated Akt has been shown to 1) phosphorylate and block the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad [8], and 2) block cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 [10]. This is supported by the observation that an activated form of Akt is able to block apoptosis [11]. PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10) gene encodes a 403-amino acid polypeptide with lipid phosphatase activity. The PTEN protein dephosphorylates position D3 of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) and generates inactive PIP₂ [12]. PIP₃ is a direct product of PI 3-K and regulates PDK1, a kinase that phosphorylates and activates Akt. Thus, PTEN is a key negative regulator of Akt activity [13]. Studies using MCF-7 cells showed that 17 β -estradiol effects are mediated through PI 3-K pathway and induced Akt phosphorylation [14,15] indicating that this survival pathway is important for estrogen signaling.

Caspases are well known and documented proteases involved in the activation of apoptosis. Once activated from their proactive forms, caspases target important proteins involved in cell proliferation and survival (for a review see [16]). Caspase-3 is one of the key executioner of apoptosis. During the execution phase of apoptosis, caspase-3 is responsible or in part for the proteolysis of a large number of substrates, each of which contains a common Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motif originally described by Lazebnik *et al.* [17]. We have recently shown that Akt is also a new target for caspase-3 cleavage, indicating that Akt survival pathway inhibition is an important mechanism for apoptosis activation [18].

Although the regulation and importance of Akt has been described in other systems, the presence and role of Akt has not been documented in the cycling uterus. Recent studies revealed that Akt phosphorylation on serine 473 as well as its nuclear translocation are stimulated by prolactin in decidual cells and act through PI-3K pathway to exert antiapoptotic effect in rat deciduas [19]. It is suggested that Akt may also be an important and regulated survival factor in endometrium during the rat estrous cycle. In the present study, regulation of apoptosis was measured in rat uterus during the four stages of estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus). Regulation of Akt survival pathway and caspase-3 activation were investigated using immunohistochemistry (IHC) and Western analysis using phospho-specific and specific-cleaved-caspase-3 antibodies to determine their involvement in the regulation of apoptotic processes.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

PhosphoPlus Akt (Ser473), PhosphoPlus Akt (Ser473) IHC specific, Akt, PTEN, procaspase-3 and cleaved specific caspase-3 antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Mediacorp (Montréal, QC). β -actin antibody was purchased through Cedarlane (Milton, ON). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). *In Situ* Cell Death detection, Protease Inhibitor Cocktail Tablets,

POD and DAB substrate were purchases from Roche (Laval, QC). 17β -Estradiol (E_2) was purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Mature Sprague-Dawley female rats (200-225g) were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated on a normal 12 hour cycle. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling (TUNEL) or endometrial protein extracts collected by scraping the endometrium for Western analysis. To determine the effect of estrogen, rats were ovariectomized for at least 10 days and then injected with E_2 . Animals were treated for a total of 3 days and killed after hormone treatment according to previous preliminary time-course studies done in our laboratory (unpublished information). E_2 was dissolved with sesame oil, and administered by subcutaneous injection. Sesame oil was injected into control animals. The dose administered was 40 $\mu\text{g/kg/day}$ (E_2).

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μm thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated with 10 mM citrate buffer (pH 6). After two wash with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody (Akt 1:100; CDC47/MCM7 1:200; Phospho-Akt IHC 1:50; PTEN 1:100 and

cleaved caspase-3 1:50) was added to the slides and incubated at 4°C overnight. After washing 5 min in PBS, tissue sections were incubated for 30 min with 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Again washed with PBS for 5 min and color development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol without primary antibody.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL)

Tissue sections were deparaffinized, rehydrated and rinsed with PBS. They were incubated with proteinase K (20 µg/ml) for 30 min at room temperature. Slides were washed two times with PBS, the endogenous peroxidase was inactivated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Slides were rinsed and incubated with 10 mM citrate solution, two min on ice. Then, tissue sections were rinsed with PBS and incubated with TdT labelling reaction (In Situ Cell Death Detection, POD) for 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed three times in PBS and tissue sections were blocked with 3% BSA for 20 min at room temperature. Converter-POD solution was added to the slides and incubated 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed 5 min in PBS, colour development was achieved using DAB substrate and counterstained with haematoxylin. Negative control was performed using the same protocol without TdT enzyme.

Protein extraction and Western analysis

Endometrium from each uterus was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in the lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Concentrations of reagents found in the lysis buffer were chosen to avoid any interference with the protein assay.

Protein extracts (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with Akt 1:1000 ; Procaspase-3 1:1000; CDC47/MCM7 1:1000; Phospho-Akt 1:250; PTEN 1:500 and cleaved caspases 1:1000 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were reprobed with a antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. Densitometrical analyses were performed on both films (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON). Results are expressed as a ratio protein of interest/ β -actin to correct for loading for each endometrial sample.

Statistical analysis

Western analyses of cycling animals were repeated six to eight times (6 to 8 different rats/endometrial extract per day of estrous cycle). Endometrial extracts from each rats was assessed individually. Western analyses of ovariectomized rats treated with E₂ were repeated 5 times (5 different rats/ endometrial extracts per group including control). Endometrial extracts from each rats was assessed individually for both studies. Results subjected to statistical analyses were expressed as means \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Apoptosis and proliferation analyses through the estrous cycle

To confirm proliferation and cell death status of endometrial cells in our current model, uteri of cycling rats were recovered to perform TUNEL, IHC and Western analyses. Estrous cycle determination was carried out using vaginal smear and animals were classified according to the type of cell present in the smear. TUNEL analysis showed that apoptosis was maximal at estrus, present at metestrus and weakly detectable at

diestrus and proestrus (Fig. 1, 2 and 3). Apoptosis was mainly located in the luminal epithelial cells at estrus. These results were in accordance with results obtained previously [3]. On the other hand, cell proliferation was maximal at proestrus as determined by the expression of CDC47/MCM7 (cell proliferation marker) and was significantly reduced at estrus. Intact form of caspase-3 (Procaspase-3) was maximal at proestrus, metestrus and diestrus but was reduced only at estrus (Fig. 1 and 3). Caspase-3 was active mainly at estrus, as demonstrated by the presence of a specific cleaved fragment using Western and IHC analyses. As shown by IHC, Western analysis revealed that CDC47/MCM7 was reduced at estrus compared to other days of the estrous cycle.

Regulation of Akt and PTEN expression and activity during the estrous cycle

In order to determine the possibility that Akt and PTEN might be regulated by sex steroids during estrous cycle, Akt and PTEN protein abundance were measured by Western analyses and localized by IHC. PTEN protein was present at all days of estrous cycle and the estrous cycle did not influence expression of this protein significantly (Fig. 4 and 5). However, expression of total Akt protein was increased from proestrus to estrus. Akt and PTEN proteins were mainly localized in the luminal and glandular epithelium as demonstrated by IHC (Fig. 5). Phospho-Akt (the activated form of Akt) was present at metestrus, diestrus and proestrus but was significantly reduced 3.1 fold at estrus (Fig. 4). IHC revealed that phospho-Akt was primarily located in the luminal and glandular epithelial cells (Fig. 5). Interestingly, as shown by Western analysis, IHC confirmed that phospho-Akt expression was lower at estrus and that phospho-Akt was predominantly localized at the membrane level facing the uterine lumen. In other days of estrous cycle (metestrus, diestrus and proestrus), phospho-Akt signal was found mainly in the cytoplasm and nucleus. These results clearly demonstrate a redistribution of Akt protein from the cytoplasm to cell membrane only at estrus.

Influence of 17 β -estradiol in the regulation of Akt expression and phosphorylation

To further determine if 17 β -estradiol might be involved in the regulation Akt phosphorylation/activity and expression, ovariectomized rats were treated with 17 β -estradiol for 3 days. The results indicated that 17 β -estradiol increased endometrial cell

proliferation significantly (as determined by the expression of CDC47/MCM7) (Fig. 6). Furthermore, 17 β -estradiol significantly induced both total Akt protein expression and phosphorylation. IHC revealed that 17 β -estradiol induced both Akt expression and phosphorylation and was found at the cellular membrane as observed at estrus. IHC studies confirmed in ovariectomized rats treated by 17 β -estradiol that both Akt expression and phosphorylation was increased in endometrial cells (Fig. 7). Increased endometrial cell proliferation (epithelial and stromal) in response to 17 β -estradiol was confirmed using CDC47/ MCM7 proliferation marker (Fig. 7).

DISCUSSION

This study is the first to show the presence, activity and regulation of Akt in the non-pregnant rat uterus. This survival factor is well known in other systems for its inhibitory effect on apoptosis triggering. Apoptosis has been shown to be present in the rat [2,3] and mouse [1] endometrium during the estrous cycle. Apoptotic index was found to be high at estrus which was accompanied with a low level of estrogen receptor- α and high level of progesterone receptor. Since in the endometrium, growth of epithelial cells is dependent on estrogens and progesterone, and removal of ovarian hormones has been reported to cause cell death in rabbit and hamster [20,21], sex steroids take part actively in the balance of proliferation versus cell death in this tissue. Indeed, the appearance of apoptosis in epithelial cells of the endometrium following ovariectomy or treatment with the antiprogestin RU486 has been described in pseudopregnant rabbits [22] and in primary cell culture [23,24]. However, molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus are poorly documented in the literature. We have recently demonstrated in human ovarian cancer cells [18] and rat granulosa cells [25] the importance of Akt phosphorylation status in relation to cell survival and chemoresistance. Many other studies have demonstrated the involvement of Akt on apoptosis inhibition through the activation of several survival factors [26]. Since apoptosis has been found in the endometrium and that a recent study showed activation of Akt in response to estradiol [27], we hypothesized that Akt might be an important regulator of uterine function throughout the rat estrous cycle. Given that menses are

absent in the rodents uterus, there must be precise intra-cellular systems involved in the regulation of cell death and cellular cleaning (proliferation versus apoptosis) in the endometrium after estrogen withdrawal in the absence of embryonic factors.

As demonstrated previously by others [3], apoptosis was evident in luminal epithelial cells at estrus and proliferation was maximal at proestrus. As hypothesized, Akt activity/phosphorylation was high at proestrus and Akt was strongly expressed and localized in the lining epithelium and glands. Indeed, Akt activity/phosphorylation decreased at estrus whereas cell proliferation was low as demonstrated by the decrease of CDC47/MCM7 proliferation marker. Although, Akt phosphorylation was reduced at estrus, IHC revealed a specific pattern of phospho-Akt expression in luminal epithelial cells and was distributed mainly at the membrane level facing the uterine lumen. Translocation at the plasma membrane of phospho-Akt from the nucleus and/or cytoplasm suggests that its presence at the membrane level may not allow phospho-Akt to be active in term of survival signaling. A recent study demonstrated that transient membrane association is required for the physiological activation of Akt indicating that correct subcellular localization is crucial for the activation of the kinase, and it may also allow its appropriate inactivation by phosphatases [28]. One example of such phosphatase is phosphatase and tensin homologue tumor suppressor PTEN [13], a phosphatase found and active at the plasma membrane [29]. PTEN directly dephosphorylates the phospholipid PIP₃ which is essential for Akt phosphorylation [12]. The present results clearly show that PTEN protein was present in the endometrium and was not influenced by hormonal changes observed during the estrous cycle. Indeed, recruitment of Akt at the membrane level may be a mechanism by which PTEN or unknown phosphatases act on Akt to inactivate its function.

Since the levels of estrogen are maximal at proestrus and further decrease at estrus, we have used ovariectomized rats to determine the possible involvement of 17 β -estradiol in the regulation of Akt phosphorylation. Akt and estrogen have been shown to be involved in the regulation and downstream signaling in different systems such as EGF, IGF-1 and GH [30,31], endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [32], and FSH [33] regulation

pathways. Recently, using both wild-type (WT) and ER alpha knockout (alpha ERKO) mice, it has been shown that ER α is necessary for IGF-1 induction of uterine nuclear proliferative responses and that IGF-1 signaling is dependent of Akt [34]. Moreover in ERKO mice, lower levels of vascular nitric oxide has been found suggesting a crucial role of ER α in the regulation of these processes [35]. A recent study showed that there was an apparent increase in Akt activity upon brief stimulation with 17 β -E2 in CHO cells transfected with ER α whereas 17 β -E2 had no effect on Akt activity in cells transfected with control vector or ER β [36]. The present results clearly showed an increase of Akt phosphorylation in response to 17 β -estradiol. As shown in another system [36], it is possible that the activation of estrogen receptor may activate Akt phosphorylation through a signaling mechanism not yet identified in the endometrium. PTEN protein expression was constant through the stages of estrous cycle studied indicating that PTEN is a constitutively expressed protein. In the human endometrium, PTEN has been shown to be regulated by progesterone [37]. However, the rat uterus does not undergo decidualization during the estrous cycle as compared to the menstrual cycle in women. Thus, PTEN might be an important protein involved in embryo implantation processes when decidualization initiate rather than a role during the regulation of estrous cycle in the rat endometrium..

Recent studies demonstrated that the transcriptional nuclear factor kappa-B (NF- κ B) is a direct downstream target of phosphorylated Akt [38]. NF- κ B is sequestered (p65 and p50 subunits) in the cytoplasm by the I κ Bs inhibitors which are phosphorylation targets of Akt. Upon phosphorylation I κ Bs are released and degraded through ubiquitination and NF- κ B enter nucleus for gene expression [39]. In the literature, we found that X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) promoter is a target for NF- κ B [40,41]. Since we have shown previously in rat granulosa cells and human ovarian surface epithelial cancer cells that XIAP might be involved in the regulation of Akt activity [18,25], it is possible that Akt may act on this family of inhibitor of apoptosis protein in order to block apoptosis processes. Whether XIAP or other inhibitor of apoptosis proteins are involved in this process remains to be investigated.

In conclusion, these results document for the first time the presence and regulation of Akt in the rat endometrium during the estrous cycle and further demonstrate that this survival factor is regulated by 17β -estradiol. Further analysis will be necessary to determine more specifically, the intra-cellular and molecular signal transducers involved in the process of apoptosis in the rat reproductive tract. Whether TNF- α or other cytokines/growth factors such as TGF- β , IGF-1 or EGF may be involved in the regulation of programmed cell death through Akt and inhibitors of apoptosis proteins in the rat uterus remain to be elucidated. Currently, investigations are carried out to further characterize the role and mechanism of Akt on cell survival/apoptosis using endometrial (epithelial and stromal cells) cultured *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mrs Rollande Caron for her support and her precious advices in regards to animal care and maintenance.

REFERENCES

1. SJ Dharma, SD Kholkute, TD Nandedkar: **Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.** *Indian J Exp Biol* 2001, **39**: 218-222.
2. MD Lai, LR Lee, KS Cheng, LY Wing: **Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.** *J Endocrinol* 2000, **166**: 87-93.
3. T Sato, Y Fukazawa, H Kojima, M Enari, T Iguchi, Y Ohta: **Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.** *Anat Rec* 1997, **248**: 76-83.
4. VE Quarmby, KS Korach: **The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus.** *Endocrinology* 1984, **114**: 694-702.
5. CA Finn, M Publicover: **Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.** *J Endocrinol* 1981, **91**: 335-340.
6. L Martin, JW Pollard, B Fagg: **Oestriol, oestradiol-17beta and the proliferation and death of uterine cells.** *J Endocrinol* 1976, **69**: 103-115.
7. L Stephens, K Anderson, D Stokoe, H Erdjument-Bromage, GF Painter, AB Holmes, PR Gaffney, CB Reese, F McCormick, P Tempst et al.: **Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.** *Science* 1998, **279**: 710-714.
8. J Hayakawa, M Ohmichi, H Kurachi, Y Kanda, K Hisamoto, Y Nishio, K Adachi, K Tasaka, T Kanzaki, Y Murata: **Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.** *Cancer Res* 2000, **60**: 5988-5994.
9. Y Suzuki, Y Nakabayashi, R Takahashi: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 8662-8667.
10. MA Davies, D Koul, H Dhesi, R Berman, TJ McDonnell, D McConkey, WK Yung, PA Steck: **Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.** *Cancer Res* 1999, **59**: 2551-2556.
11. SG Kennedy, AJ Wagner, SD Conzen, J Jordan, A Bellacosa, PN Tsichlis, N Hay: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.** *Genes Dev* 1997, **11**: 701-713.

12. T Maehama, JE Dixon: **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 13375-13378.
13. V Stambolic, A Suzuki, JL de la Pompa, GM Brothers, C Mirtsos, T Sasaki, J Ruland, JM Penninger, DP Siderovski, TW Mak: **Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.** *Cell* 1998, **95**: 29-39.
14. R Duan, W Xie, X Li, A McDougal, S Safe: **Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **294**: 384-394.
15. G Castoria, A Migliaccio, A Bilancio, M Di Domenico, A de Falco, M Lombardi, R Fiorentino, L Varricchio, MV Barone, F Auricchio: **PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells.** *EMBO J* 2001, **20**: 6050-6059.
16. GM Cohen: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**: 1-16.
17. YA Lazebnik, SH Kaufmann, S Desnoyers, GG Poirier, WC Earnshaw: **Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.** *Nature* 1994, **371**: 346-347.
18. E Asselin, GB Mills, BK Tsang: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**: 1862-1868.
19. C Tessier, A Prigent-Tessier, S Ferguson-Gottschall, Y Gu, G Gibori: **PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity.** *Endocrinology* 2001, **142**: 4086-4094.
20. S Nawaz, MP Lynch, P Galand, LE Gerschenson: **Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium.** *Am J Pathol* 1987, **127**: 51-59.
21. BA Sandow, NB West, RL Norman, RM Brenner: **Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium.** *Am J Anat* 1979, **156**: 15-35.
22. S Nawaz, MP Lynch, P Galand, LE Gerschenson: **Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium.** *Am J Pathol* 1987, **127**: 51-59.
23. LE Gerschenson, JR Depaoli, JT Murai: **Inhibition of estrogen-induced proliferation of cultured rabbit uterine epithelial cells by a cell density-dependent factor produced by the same cells.** *J Steroid Biochem* 1981, **14**: 959-969.

24. MP Lynch, S Nawaz, LE Gerschenson: **Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 4784-4788.
25. E Asselin, Y Wang, BK Tsang: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**: 2451-2457.
26. SR Datta, A Brunet, ME Greenberg: **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 1999, **13**: 2905-2927.
27. GE Stoica, TF Franke, A Wellstein, F Czubayko, HJ List, R Reiter, E Morgan, MB Martin, A Stoica: **Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway.** *Mol Endocrinol* 2003, ..
28. M Andjelkovic, DR Alessi, R Meier, A Fernandez, NJ Lamb, M Frech, P Cron, P Cohen, JM Lucocq, BA Hemmings: **Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 31515-31524.
29. M Iijima, P Devreotes: **Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients.** *Cell* 2002, **109**: 599-610.
30. MB Martin, TF Franke, GE Stoica, P Chambon, BS Katzenellenbogen, BA Stoica, MS McLemore, SE Olivo, A Stoica: **A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I.** *Endocrinology* 2000, **141**: 4503-4511.
31. LN Shoba, M Newman, W Liu, WL Lowe, Jr.: **LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes.** *Endocrinology* 2001, **142**: 3980-3986.
32. T Simoncini, G Varone, L Fornari, P Mannella, M Luisi, F Labrie, AR Genazzani: **Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator.** *Endocrinology* 2002, **143**: 2052-2061.
33. IJ Gonzalez-Robayna, AE Falender, S Ochsner, GL Firestone, JS Richards: **Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**: 1283-1300.
34. DM Klotz, SC Hewitt, P Ciana, M Raviscioni, JK Lindzey, J Foley, A Maggi, RP DiAugustine, KS Korach: **Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 8531-8537.

35. GM Rubanyi, AD Freay, K Kauser, D Sukovich, G Burton, DB Lubahn, JF Couse, SW Curtis, KS Korach: **Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption.** *J Clin Invest* 1997, **99**: 2429-2437.
36. K Hisamoto, M Ohmichi, H Kurachi, J Hayakawa, Y Kanda, Y Nishio, K Adachi, K Tasaka, E Miyoshi, N Fujiwara et al.: **Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 3459-3467.
37. GL Mutter, MC Lin, JT Fitzgerald, JB Kum, C Eng: **Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle.** *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**: 2334-2338.
38. LP Kane, VS Shapiro, D Stokoe, A Weiss: **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**: 601-604.
39. SY Foo, GP Nolan: **NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation.** *Trends Genet* 1999, **15**: 229-235.
40. C Stehlik, R de Martin, I Kumabashiri, JA Schmid, BR Binder, J Lipp: **Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *J Exp Med* 1998, **188**: 211-216.
41. CW Xiao, K Ash, BK Tsang: **Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *Endocrinology* 2001, **142**: 557-563.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Proliferation and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by Western analyses. Rats were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) and total endometrial proteins were collected. A) Proliferation as determined by Western analysis of CDC47/MCM7. B) Apoptosis as determined by Western analysis of intact and cleaved caspase-3. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments for CDC47/MCM7 and five for intact and cleaved caspase-3. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blots densitometrical analysis. Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

Figure 2 Proliferation and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by TUNEL and IHC. Rats were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected, fixed and sectioned for detection of apoptotic cells by TUNEL and IHC of CDC47/MCM7 and cleaved caspase-3. IHC and TUNEL shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of estrous cycle. Arrows indicate example of apoptotic cells. L = lumen, LE = luminal epithelium, S = stroma.

Figure 3 Apoptotic and proliferative endometrial cell count during the estrous cycle. TUNEL and IHC of CDC47/MCM7 were used to count positive apoptotic and proliferative luminal epithelial cells as shown in figure 2. A minimum of 200 luminal epithelial cells per day of estrous cycle were

counted in each experiment and results are presented as the percentage of proliferative positive-cells (A), % of TUNEL apoptotic-positive cells (B), and % of cleaved caspase-3 positive cells (C). Data represent the mean \pm SEM of six different rat endometrial sections per day of estrous cycle.

Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

*Significantly different ($p < 0.05$).

Figure 4

Expression of Akt, Phospho-Akt and PTEN during the estrous cycle. Endometrial proteins were extracted from uteri at different days of estrous cycle for Western analysis: A) Akt, B) Phospho-Akt and C) PTEN. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Graphics represent Western blots densitometrical analysis: Akt (mean \pm SEM of seven independent experiments), Phospho-Akt (mean \pm SEM of six independent experiments) and PTEN (mean \pm SEM of eight independent experiments). Blots shown are from one representative experiment.

Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

Figure 5

IHC of Akt, Phospho-Akt and PTEN in rat endometrium during the estrous cycle. IHC shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of estrous cycle. Arrows indicates strong redistribution of Akt and Phospho-Akt at the membrane level. LE = luminal epithelium, S = stroma.

Figure 6

Expression of CDC47/MCM7 (A), Akt (B) and Phospho-Akt (C) in response to 17β -estradiol (E_2) in rat endometrium. Animals were

ovariectomized for at least 10 days and then injected daily with E₂ (or vehicle for control group) for 3 days. Rats were killed and endometrial proteins were collected for Western analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent western blots densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of five independent experiments (5 different rats/endometrial extract per treatment group).

*Significantly different from control ($p < 0.001$).

Figure 7

IHC of CDC47/MCM7, Akt and Phospho-Akt in response to 17 β -estradiol (E₂) in rat endometrium. Animals were ovariectomized for at least 10 days and then injected daily with E₂ (or vehicle for control group) for 3 days. Rats were killed and their uteri collected, fixed and sectioned for IHC. IHC shown are from one representative experiment and were repeated five times using five different uterine sections from five different rats per day of estrous cycle. Arrow indicates strong redistribution of Phospho-Akt at the membrane level. LE = luminal epithelium, S = stroma.

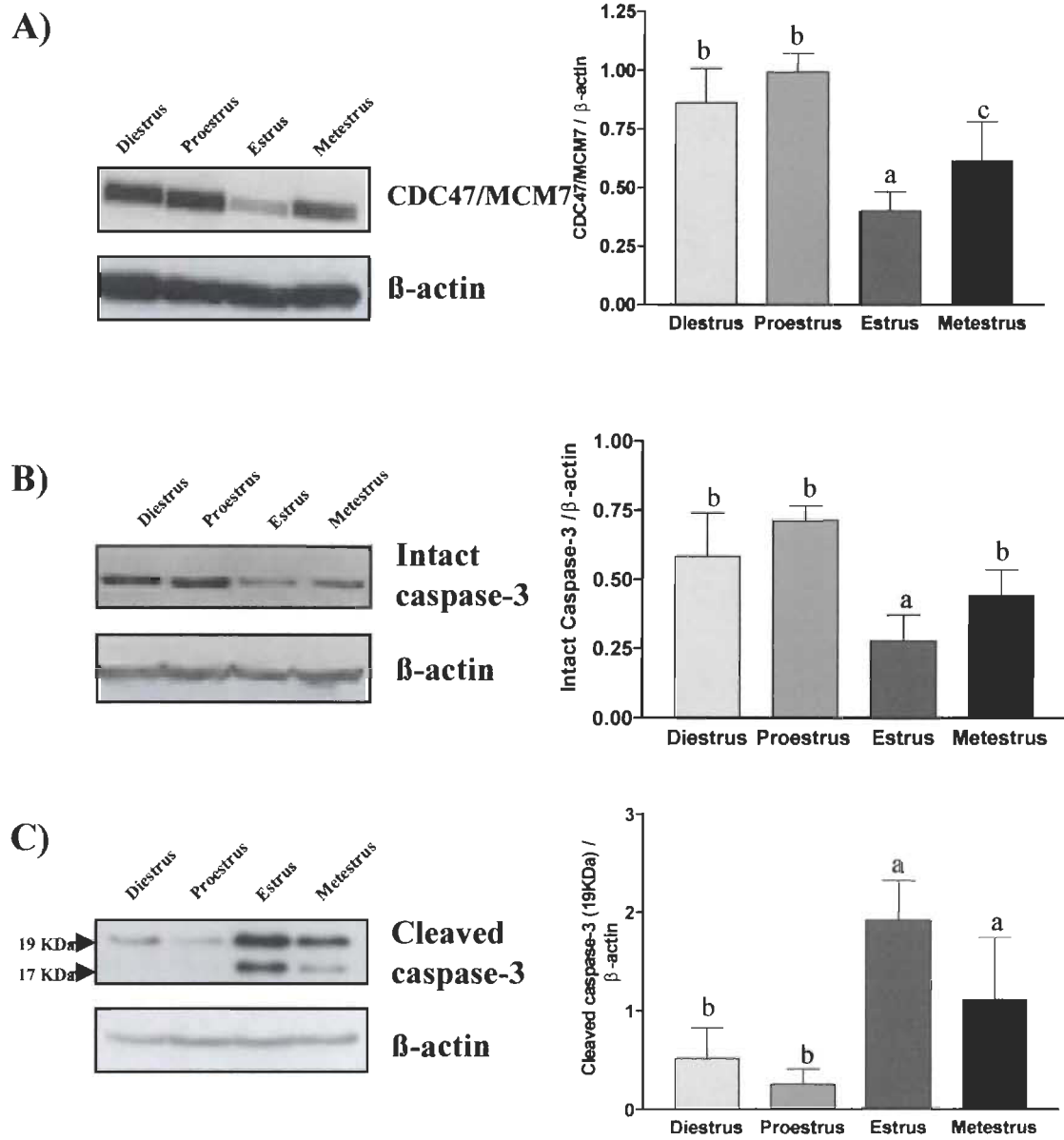


Figure 1; Dery et al.

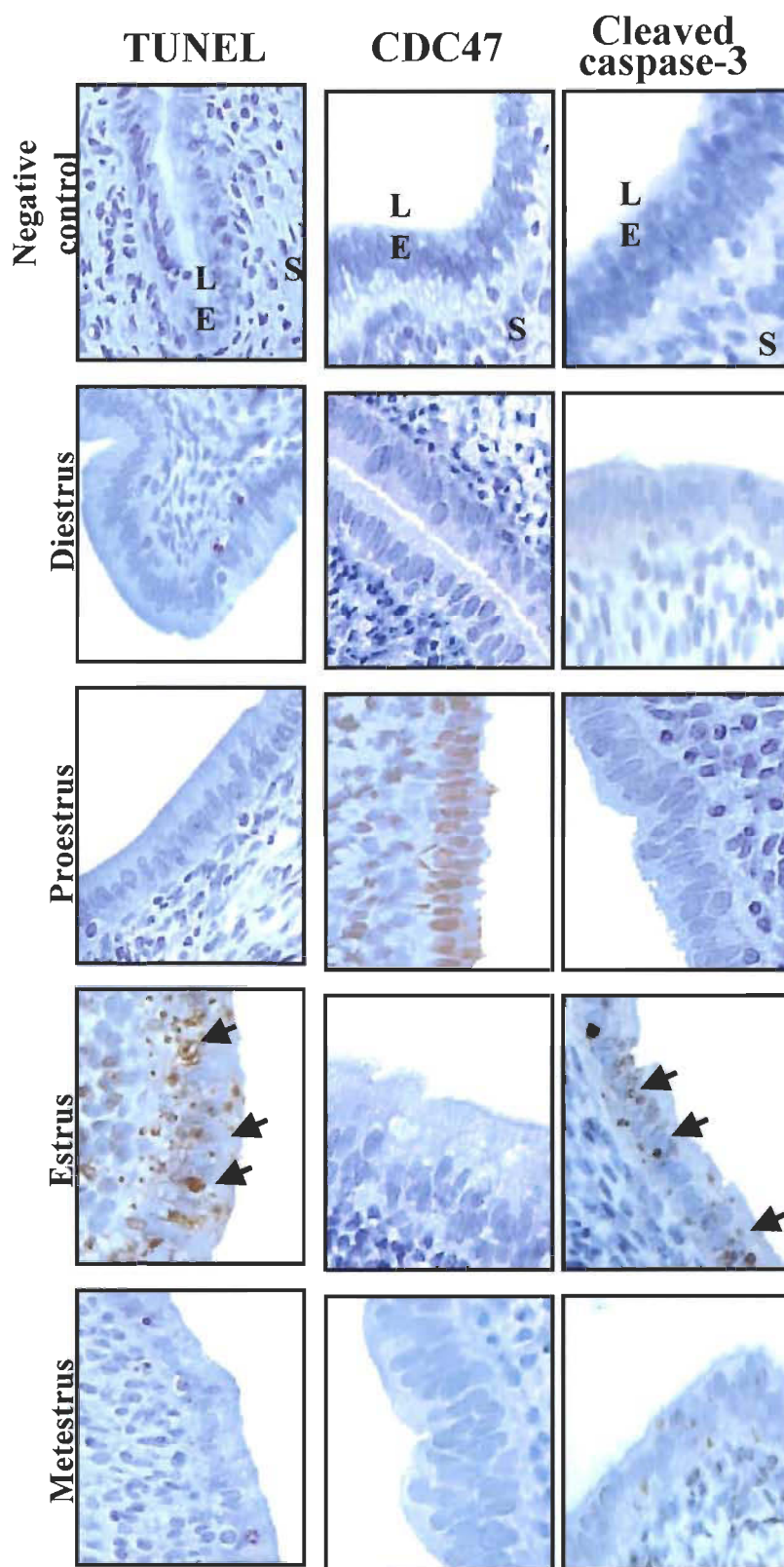


Figure 2; Dery et al.

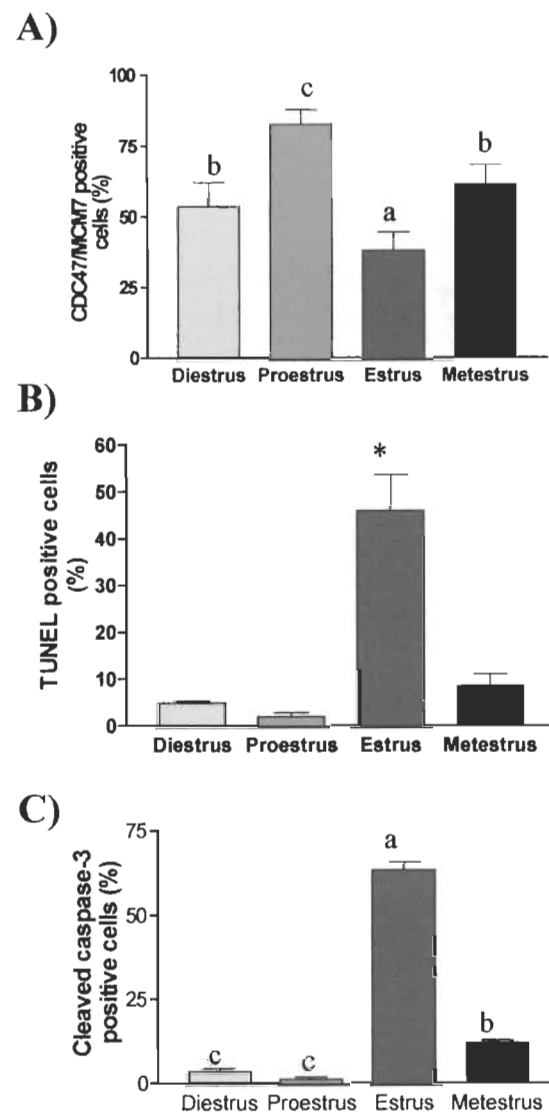


Figure 3; Dery et al.

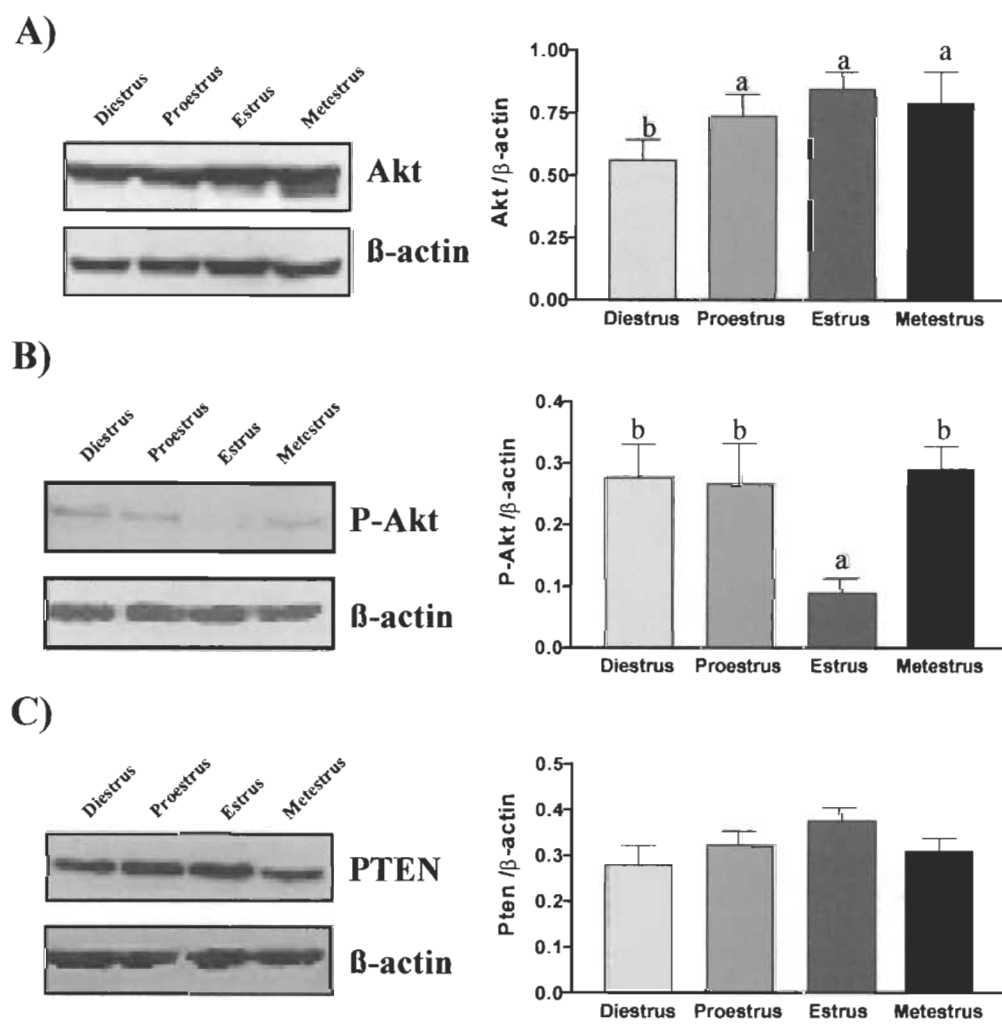


Figure 4; Dery et al.

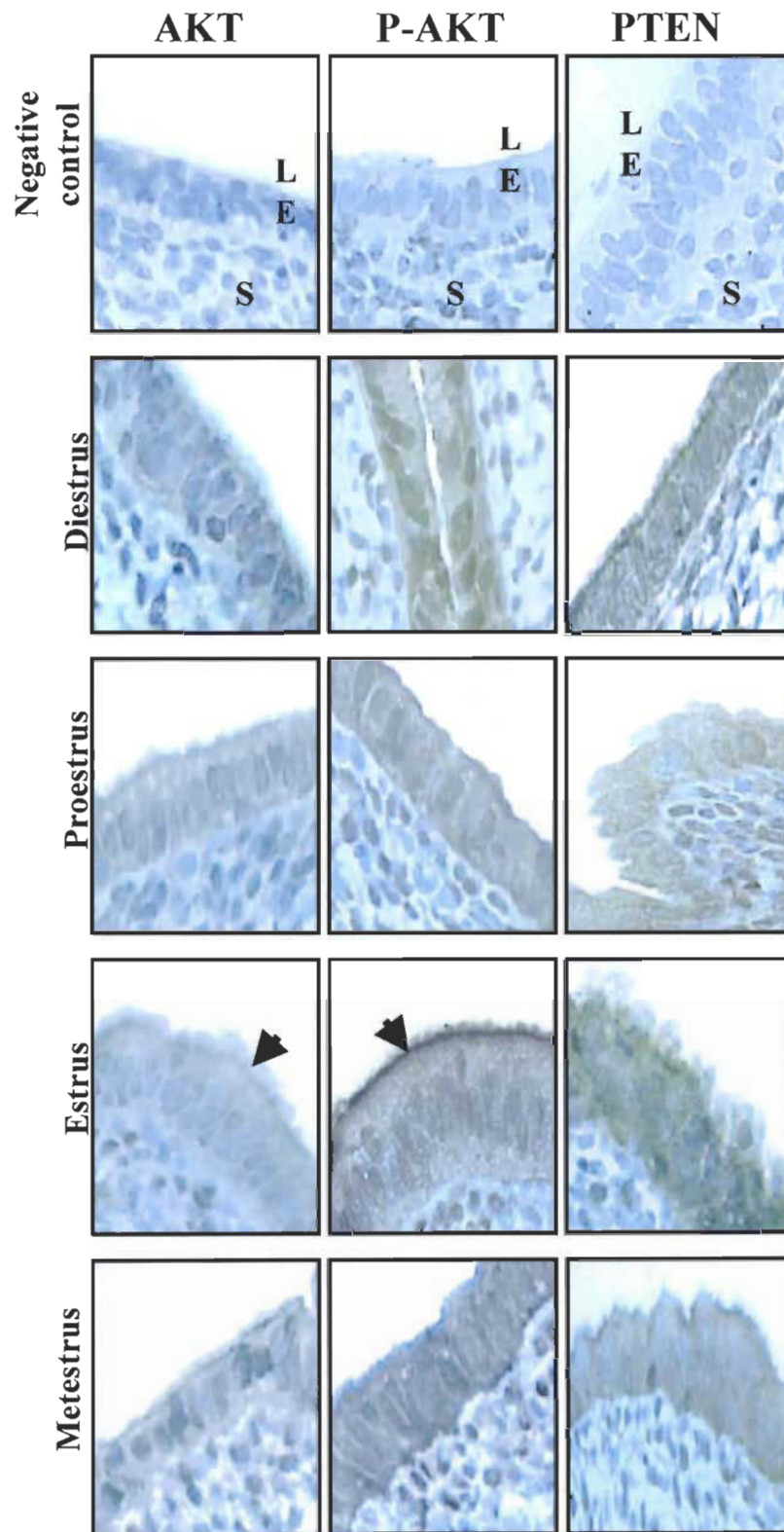


Figure 5; Dery et al.

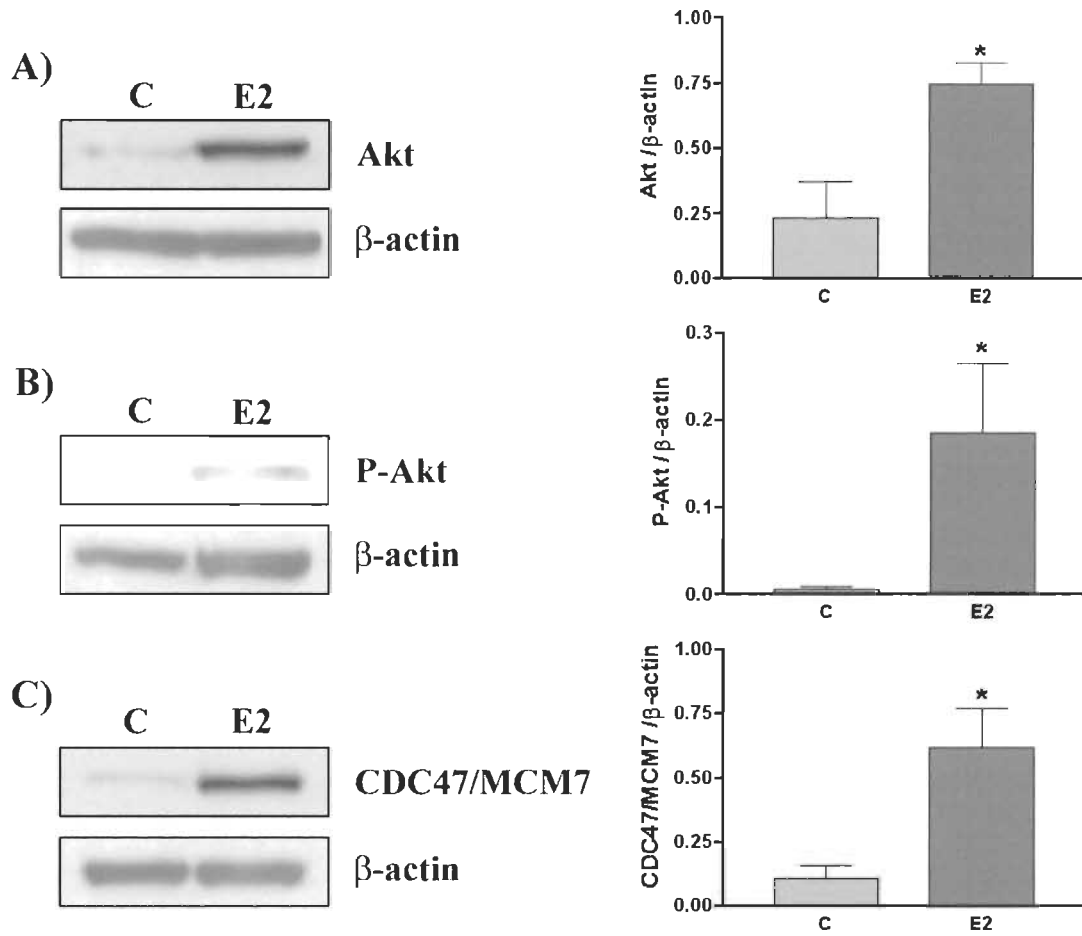


Figure 6; Dery et al.

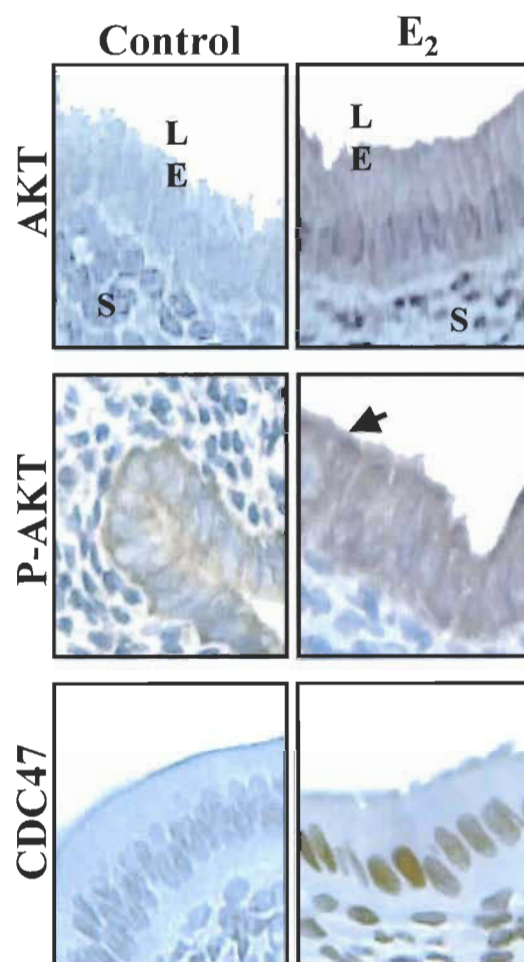


Figure 7; Dery et al.

CHAPITRE 3
OPPOSITE REGULATION OF XIAP AND SMAC/DIABLO IN THE RAT
ENDOMETRIUM IN RESPONSE TO 17BETA-ESTRADIOL AT ESTRUS

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre III (publié dans la revue *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003 : 1 : 59 (12 pages)) sont Valérie Leblanc (fait les expériences en relation avec le 17β -estradiol, expérimentations avec les animaux, figures, écriture d'une partie des matériel et méthodes), Marie-Claude Déry (fait les expériences en relation avec le cycle, figures, écriture d'une partie des matériel et méthodes), Carl Shooner (fait les ovariectomies) et Eric Asselin, directeur de recherche (écriture et correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Durant le cycle oestral du rat, l'endomètre prolifère en réponse aux stéroïdes sexuels et les cellules endométriales ciblées entrent en apoptose en l'absence de facteurs embryonnaires. Les exécuteurs principaux de l'apoptose est une famille de protéases spécifiques connue sous le nom de caspases. Smac/DIABLO est relargué de la mitochondrie durant l'apoptose et sa stimulation enclenche l'activation des caspases en neutralisant les membres de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs, tel que X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). Le but de cette étude est d'étudier l'implication de Smac/DIABLO et de XIAP dans le contrôle de l'activation des caspases dans l'endomètre des rates cyclées. Les femelles régulières sont euthanasiées à chaque jour du cycle (diestrus, proestrus, estrus, métestrus). Les protéines endométriales sont extraites pour analyse de type Western Blot. Les cornes utérines sont prélevées pour effectuer les analyses immunohistochimiques. Nous avons déjà démontré, ainsi que d'autres équipes, la présence d'apoptose en estrus dans l'épithélium utérin du rat. Dans cette étude, les caspases 3, -6, -7 clivées sont détectées en estrus. L'immunohistochimie confirme la présence de la caspase-3 seulement dans l'épithélium luminaire et glandulaire en estrus. XIAP est fortement exprimé en estrus à la fois dans les cellules épithéliales et stromales. Par contre, l'expression de Smac/DIABLO est élevée en diestrus, proestrus et métestrus mais est minimale en estrus. Les traitements des rates ovariectomisées avec le 17 β -estradiol stimule l'expression de XIAP et inhibe celle de Smac/DIABLO. La présence des fragments des caspases clivées 3, -6, -7 augmentent suivant le traitement au 17 β -estradiol. L'expression de la voie de NK-kappa B comprenant IkB et phospho-IkB, est présente au cours du cycle mais ne démontre aucune régulation en regard du cycle. Ces résultats suggèrent que Smac/DIABLO et XIAP soient régulés différemment et peuvent jouer un rôle important dans la destinée des cellules endométriales. De plus, cette étude confirme le rôle clé des caspases au niveau des processus apoptotiques en estrus dans l'utérus de la rate.

**Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in
response to 17beta-estradiol at estrus**

Valerie Leblanc¹, Marie-Claude Dery¹, Carl Shooner¹ and Eric Asselin*¹

¹ Département de Chimie-Biologie, Section Biologie Médicale, Université du Québec à
Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Corresponding Author

E-mail: Valerie Leblanc Valerie_Leblanc@uqtr.ca; Marie-Claude Dery Marie-Claude_Dery@uqtr.ca; Carl Shooner Carl_Shooner@uqtr.ca; Eric Asselin*
Eric_Asselin@uqtr.ca;

ABSTRACT

During rat estrous cycle, the endometrium proliferates in response to sex steroids and specific endometrial epithelial cells undergo apoptosis in absence of embryonic factors. The central executioner of apoptosis is a family of aspartic acid-specific cysteine proteases known as caspases. Smac/DIABLO is released from the mitochondria during apoptosis and its stimulation promotes caspases activation by neutralizing members of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family, such as X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). The aim of this study was to investigate the involvement of Smac/DIABLO and XIAP in the control of caspases activation in endometrium of cycling rats. Polyoestrus female rats were sacrificed at each stage of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metestrus). Endometrial protein extracts were collected to perform Western Blot analysis. Alternatively, uterine horns were sectioned for immunohistochemistry (IHC). We and others showed previously the presence of apoptosis at estrus in rat uterine epithelium. In the present study, cleaved caspase-3, -6, and -7 fragments were detected at estrus. IHC confirmed that caspase-3 was present only in luminal and glandular epithelium at estrus. XIAP was highly expressed at estrus in both epithelial and stromal cells. In contrast, expression of Smac/DIABLO was elevated at diestrus, proestrus and metestrus but was minimal at estrus. Treatment of ovariectomized rats with 17 β -estradiol induced XIAP expression and inhibited Smac/DIABLO protein expression in the endometrium. Cleaved caspase-3, -6, and -7 fragments increased in endometrial protein extracts following 17 β -estradiol treatment. Expression of NF- κ B and I κ B proteins, and I κ B phosphorylation status were detected in the endometrium but were not influenced by the estrous cycle. These findings suggest that Smac/DIABLO and XIAP are regulated differently and may play important roles in the regulation of endometrial cell fate. Moreover, this study confirms a key role for executioner caspases in the control of apoptotic processes at estrus in the rat uterus.

INTRODUCTION

In the absence of embryonic factors during pre-implantation period in uterine luminal epithelium, glands and stroma cell death is found in a cycling fashion through the estrous cycle by a mechanism known as apoptosis. Estrogens and progesterone are directly responsible for the histological and morphological changes in the uterus during estrous cycle. Studies have shown that apoptosis was induced in luminal epithelium at estrus in mouse [1] and rat [2,3]. Other studies have shown that estrogen induces uterine epithelial cell proliferation and estrogen withdrawal results in cell death [4-6]. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus. Our group has recently demonstrated that Akt, a serine/threonine protein kinase also known as PKB, is an important kinase involved in the control of endometrial cell proliferation and its expression and phosphorylation/activation are regulated during the estrous cycle, particularly through the action of 17β -estradiol [7]. We have further showed a decrease in Akt activity at estrus which was accompanied by an increase in apoptosis in luminal epithelial cells[7]. Whether downstream Akt targets might be involved in the regulation of proliferation/cell death in the endometrium is unknown.

X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a well known inhibitor of caspase-3, -7 and -9 [8,9]. XIAP belongs to a family of IAP genes which represent critical regulatory factors of apoptosis signaling and regulation. The IAP family also includes c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP1), NAIP and Survivin [10]. Recently, we demonstrated in rat granulosa cells and human ovarian surface epithelial cancer cells that XIAP overexpression induces Akt phosphorylation/activation [11,12]. Akt is activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [13-15] through phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Once phosphorylated Akt has been shown to 1) phosphorylates and blocks the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad [14], and 2) block cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 [16]. The kinase Akt has been shown to induces phosphorylation of procaspase-9, suggesting that caspase processing and apoptosis can be directly regulated by protein

phosphorylation [17]. This is supported by the observation that an activated form of Akt is able to block apoptosis [18].

At the time of apoptosis induction Smac/DIABLO is released from mitochondria into the cytosol, where it binds to IAPs and enables caspase activation [19]. It has been shown that Smac/DIABLO promotes not only the proteolytic activation of procaspase-3 but also the enzymatic activity of mature caspase-3, both of which depend upon its ability to interact physically with IAPs [19]. Smac/DIABLO is synthesized with an N-terminal mitochondrial targeting sequence that is proteolytically removed during maturation to the mature polypeptide. X-ray crystallography has shown that the first four amino acids (AVPI) of mature Smac/DIABLO bind to a portion of the third BIR (BIR3) domain of XIAP [20]. This N-terminal sequence is essential for binding IAPs and blocking their antiapoptotic effects [20].

Caspases are well known executioners of apoptosis. Once activated from their proactive forms, caspases target important proteins involved in cell proliferation and survival (for a review see [21]). Caspase-3 is one of the key executioner of apoptosis and induces downstream caspase-6 which in turn target cleavage of important structural proteins such as laminin and keratins [22,23]. Among other caspase targets, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP, 113–116 kDa), a nuclear enzyme which is activated during DNA damage, is known to be cleaved by caspases-3 and -7 [24]. We have recently demonstrated that Akt is also a target for caspase-3 cleavage, indicating that Akt survival pathway inhibition is an important mechanism for apoptosis activation [12].

Although the regulation and importance of XIAP and Smac/DIABLO has been described in other systems and cell types, their expression has not been reported for the uterus. In the present study, we have investigated the regulation of XIAP, Smac/DIABLO, caspase-3, -6 and -7 during the four stages of estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus) and further analyses were carried out to determine the possible regulation of XIAP and Smac/DIABLO by 17 β -estradiol in ovariectomized rats.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

XIAP, Smac/DIABLO, NF- κ B, I κ B, Phospho-I κ B and cleaved-caspases antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). Protease Inhibitor Cocktail Tablets, POD and DAB substrate were purchased from Roche (Laval, QC). 17 β -estradiol (E₂) was purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Mature Sprague-Dawley female rats (200-225g) were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated on a normal 12 hour cycle. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) or endometrial protein extracts collected by scraping the endometrium for Western analysis. To determine the effect of estrogen, rats were ovariectomized for at least 10 days and then injected with (17 β -estradiol) E₂. Animals were treated for a total of 3 days and killed after hormone treatment (72 hours) according to previous preliminary time-course studies done in our laboratory (Leblanc et al., unpublished information) and information found in the literature [25]. E₂ was dissolved with sesame oil, and administered by subcutaneous injection. Sesame oil was injected into control animals. The dose administered was 40 μ g/kg/day (E₂).

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated with 10 mM citrate buffer (pH 6). After two wash with PBS,

slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody (XIAP 1:200; Smac/DIABLO 1:100; and cleaved caspase-3 1:100) was added to the slides and incubated at 4°C overnight. After washing 5 min in PBS, tissue sections were incubated for 30 min with 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Again washed with PBS for 5 min and colour development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol without the presence of primary antibody.

Protein extraction and Western analysis

Endometrium from each uterus was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in the lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Concentrations of reagents found in the lysis buffer were chosen to avoid any interference with the protein assay. Protein extracts (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with XIAP 1:500; Smac/DIABLO 1:500; Caspase-3 1:1000; Caspase-6 1:1000; Caspase-7 1:1000; NF- κ B 1:1000; I κ B 1:1000; Phospho-I κ B 1:500 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were reprobbed with a antibody specific to α -actin which was used as an internal standard. Densitometrical analyses were performed on both films (protein of interest and α -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON). Results are expressed as a ratio protein of interest/ β -actin to correct for loading for each endometrial sample.

Statistical analysis

Western analyses of cycling animals were repeated four to six times (one rat per extract/day repeated 4 to 6 different times). Endometrial extracts from each rats was assessed individually. Western blot analyses were performed with samples from ovariectomized rats treated with E₂ (4 rats/group). Endometrial extracts from each rats was assessed individually for both studies. Results subjected to statistical analyses were expressed as means \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

RESULTS

Caspases activation during the estrous cycle.

We have shown previously that apoptosis was maximal at estrus and weakly detectable at metestrus, diestrus and proestrus [7]. Apoptosis was mainly located in luminal epithelial cells at estrus. On the other hand, cell proliferation was maximal at proestrus as determined by expression of the cell proliferation marker CDC47/MCM7 [7]. Since executioner caspases such as caspase-3, -6 and -7 are key proteases involved in the execution of apoptosis, we have investigated, using antibodies specific for activated forms (cleaved fragments), their expression in the endometrium throughout estrous cycle. Caspase-3 fragments were detected in greatest amounts at estrus (Fig.1). Caspase-3 19 KDa fragment was weakly detectable at diestrus and proestrus, maximal at estrus and further reduced at metestrus. Likewise, caspase-3 17 KDa fragment was detected only at estrus and metestrus but was significantly reduced at metestrus compared to estrus. Large cleaved caspase-6 subunit (18 KDa) was absent at diestrus and proestrus, maximal at estrus and reduced at metestrus. Similarly, large cleaved caspase-7 subunit (19 KDa) was weakly detected at diestrus and proestrus, was highly increased at estrus and reduced at metestrus. IHC studies using the antibody specific for cleaved caspase-3 (cleaved caspase-6 and -7 antibodies are not functional for IHC) revealed that cleaved caspase-3 fragment signal was located in apoptotic luminal epithelial cells at estrus and that the signal was absent in proliferative endometrium at proestrus.

XIAP and Smac/DIABLO expression during the estrous cycle.

Expression of XIAP and Smac/DIABLO proteins has not been reported for the uterus. Because we have demonstrated previously a possible link between XIAP and survival factor Akt [11,12] and further that Akt expression and activity/phosphorylation are regulated by 17 β -estradiol in rat endometrium [7], we have asked the question whether XIAP and its inhibitor Smac/DIABLO might have important roles in the control of endometrial cell fate. Western blot revealed that XIAP protein was present at all stages of the estrous cycle, but maximal at estrus (Fig.2; 2.9-fold increase compared to proestrus; $p<0.05$). IHC revealed that XIAP expression was high in stromal cells and in both luminal and glandular epithelial cells at estrus (Fig.3). Expression of Smac/DIABLO during estrous cycle was similar at metestrus, diestrus and proestrus but was significantly reduced at estrus (Fig.2; 3.6-fold decrease compared to proestrus; $p<0.05$). IHC confirmed downregulation of Smac/DIABLO at estrus and showed that it was localized mainly in epithelial cells but was also present in stromal cells (Fig.3).

Effect of 17 β -estradiol on XIAP and Smac/DIABLO expression and caspases activation.

To further determine importance of 17 β -estradiol in the regulation of XIAP and Smac/DIABLO, ovariectomized rats were treated with 17 β -estradiol and uteri were recovered for Western analysis (Fig.4) and IHC (Fig.5) analyses. Our previous results indicated that 17 β -estradiol increased significantly endometrial cell proliferation (as determined by the expression of CDC47/MCM7) and increased Akt protein expression and its phosphorylation/activity [7]. In the present study, results shows that 17 β -estradiol induced significantly XIAP protein expression (4.0-fold compared to control; $p<0.05$) whereas it significantly inhibited Smac/DIABLO protein expression (2.7-fold compared to control; $p<0.05$) (Fig.4). IHC analysis in ovariectomized rats confirmed the increase of XIAP expression and inhibition of Smac/DIABLO in the endometrium (Fig.5). As observed during estrous cycle (Fig.3), XIAP and Smac/DIABLO proteins were found mainly in epithelial cells but were also present in stroma (Fig.5). The effect of 17 β -estradiol on the regulation of XIAP and Smac/DIABLO support the mitogenic role of 17 β -estradiol and its involvement in cell survival.

NF- κ B pathway regulation through the estrous cycle.

The NF- κ B pathway has been shown to be activated by Akt in several cell types (for a review [26]). Furthermore, it has been shown that XIAP expression is up-regulated once NF- κ B is activated and translocated to the nucleus [27,28]. The activation of NF- κ B proceeds through the phosphorylation of its inhibitor, I κ B α , that targets it for polyubiquitination and subsequent enzymatic degradation by the 26S ubiquitin proteasome [29]. Since we have showed an increase of Akt phosphorylation in response to E₂ [7], we sought to determine if NF- κ B/I κ B pathway might be involved in the regulation of XIAP expression in response to 17 β -estradiol. The present study shows that NF- κ B (both p50 and p65 subunits) and I κ B proteins were both expressed in the endometrium but were not influenced by the estrous cycle (Fig.6). Since I κ B phosphorylation status is a sign of NF- κ B activation, we also carried out Western analyses using a phospho specific I κ B antibody (Fig.6C). The results showed that phosphorylation of I κ B was detected at all days of estrous cycle but was not influenced by the estrous cycle. These results demonstrate that NF- κ B/I κ B pathway is not involved in the regulation of XIAP expression in the cycling rat uterus.

DISCUSSION

We and other have demonstrated the presence of apoptosis in the rat [2,3,7] and mouse [1] endometrium during the estrous cycle. Although our recent study showed that regulation of Akt survival pathway is a key factor involved in the regulation of endometrial cell fate during estrous cycle [7], molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus are poorly documented in the literature. Since menses are absent in rodent specie, there must be precise intra-cellular mechanisms involved in the regulation of cell fate in the endometrium after estrogen withdrawal in the absence of embryonic factors. We have previously demonstrated in human ovarian cancer cells [12] and rat granulosa cells [11] the importance of XIAP and Akt expression/activity. In the present study, regulation of XIAP and

Smac/DIABLO have been investigated in rat uterus to determine their importance and their possible influence on endometrial cell survival/death in relation to the stage of estrous cycle.

In the present study, expression of XIAP was maximum at estrus and increased in response to E_2 in ovariectomized rats. XIAP was strongly expressed in luminal and glandular epithelia and stroma during estrus, perhaps to protect these cells from apoptosis. Although stimulation of XIAP by E_2 is consistent with mitogenic activity and apoptosis inhibitory activity, it is not clear why XIAP expression does not increase during proestrus. A recent study showed that XIAP may be directly regulated by the presence of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat granulosa cells [27]. Since it has been shown that TNF- α mRNA expression was high at estrus and was regulated by estrogen in the mouse uterus [30], a similar process may be involved in the endometrium. Thus, action of E_2 on XIAP expression might be indirect and might involve specific factors regulated upstream and/or downstream by this hormone. Whether involvement of TNF- α or other growth factors/cytokines might be involved in this process remains to be elucidated.

In contrast, Smac/DIABLO was decreased at estrus and E_2 treatment in ovariectomized rats reduced its expression. These results directly support the mitogenic action of estrogens on endometrial cells. Since Smac/DIABLO is a pro-apoptotic protein, its down-regulation may be sufficient to activate XIAP to inhibit caspase activity. Smac/DIABLO down-regulation also support our results obtained at estrus showing apoptosis predominantly in luminal epithelial cells [7] and suggest that this pro-apoptotic factor might have a key function in triggering apoptosis at this particular time of rat estrous cycle. There is currently no information available in the literature demonstrating that E_2 modulates Smac/DIABLO expression and the present findings are the first to demonstrate this mechanism. E_2 treatment resulted in the cleavage of caspase-3, -6 and -7 in endometrial cells. This results was contradictory to the fact that E_2 induces endometrial cells proliferation rather than inducing activation of the caspase cascade and apoptosis. Although it has been shown that E_2 triggers apoptosis in a preosteoclastic cell line *in vitro* [31] and in thymocytes of ovariectomized mice *in vivo* [32], it is unlikely that E_2 induced apoptosis in the

endometrium. This can be explained by the fact that following injection of ovariectomized rats with E₂, latent endometrial cells are forced to proliferate and they might be in a situation of stress. Indeed, controlling the balance between survival and death factors is a key mechanism in order to maintain homeostasis in the proliferating endometrium. Increased caspase cleavage is not necessarily a sign of apoptosis activation; caspases activity can be blocked by the presence of high levels of XIAP (or other known or unknown inhibitor of apoptosis proteins such as cIAPs [33]) and the presence of low levels of Smac/DIABLO. This particular mechanism in endometrial cells might be important in order to rapidly induce apoptosis at the appropriate timing (at estrus for instance) through the simple inhibition or degradation of XIAP protein through its ubiquitin protein ligase activity its degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli [34].

Another explanation for the induction of caspase activation in response to E₂ might be due to the presence and activity of E₂ metabolites. For example, 2-Methoxyestradiol (2ME2), a natural metabolite of E₂, is a potent antitumor and antiangiogenic agent [35] and has been shown to induce apoptosis in several cell type (for a review see [36]). Furthermore, 2ME2 is currently tested in clinical trials for cancer therapies [36]. 2ME2 is a major metabolite of estradiol in human serum and its concentration peaks at mid-cycle, like that of estradiol [37]. Studies have shown that 2ME2 acts through other signaling pathways than E₂ [38,39]. A recent study revealed that 2ME2 treatment resulted in up-regulation of death receptor 5 (DR5) protein expression *in vitro* and *in vivo* and rendered cells more sensitive to the cytotoxic activities of the DR5 ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [40]. In addition, the latter study demonstrated that 2ME2-induced apoptosis required activation of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 [40]. Another recent study also showed induction of caspase-3 and apoptosis in response to 2ME2 in gastric carcinoma cells [41]. These observations established in other systems and cell types suggest that 2ME2 could be an element of investigation in order to determine how E₂ might be involved in the induction of caspase cleavage in rat endometrium and the possibility that activation of caspases observed might not be a direct action of E₂.

Recent studies demonstrated that the transcriptional nuclear factor kappa-B (NF- κ B) is a direct downstream target of phosphorylated Akt [42]. NF- κ B is sequestered (p65 and p50 subunits) in the cytoplasm by the I κ Bs inhibitors which are phosphorylation targets of Akt. Upon phosphorylation I κ Bs are released and degraded through ubiquitination and NF- κ B enter nucleus for gene expression [43]. In the literature, we found that XIAP promoter is a target for NF- κ B [27,28]. Since we have recently demonstrated the activation of Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium and that Akt has been shown to activate NF- κ B signaling pathway [42], we wanted to know if Akt/ NF- κ B/I κ B pathway might be involved in the regulation of XIAP expression. Results of the present study showed that there was no difference in the expression of NF- κ B and I κ B nor I κ B phosphorylation during the four stages of estrous cycle which exclude the involvement of this pathway in the regulation of XIAP or Smac/DIABLO expression. Other pathways downstream of Akt known to be regulated by this kinase are currently investigated in our laboratory such as eNOS [44,45], Bad [46], glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) [47,48], and caspase-9 [49]. A recent report further demonstrated that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induced activation of Akt, NF- κ B and induced phosphorylation of Forkhead transcription factor (FKHR), which in turn up-regulated a series of intracellular anti-apoptotic proteins such as XIAP [50]. Because, FKHR is also a well known target for Akt action [51], phosphorylation, activity and regulation of this transcription factor in the uterus needs to be investigated.

In conclusion, the present study showed for the first time the presence and regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium and further demonstrated that these two survival factors are regulated in the opposite direction by E₂. Further analysis will be necessary to determine more specifically, the intra-cellular and molecular signal transducers involved in the process of apoptosis in the rat reproductive tract and to determine the mechanism by which XIAP and Smac/DIABLO are regulated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a recipient of a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We are grateful to Mrs Rollande Caron who brought a lot technical expertise with animals and gave plenty of her precious time for these studies.

REFERENCES

1. Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD: **Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.** *Indian J Exp Biol* 2001, **39**: 218-222.
2. Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LY: **Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.** *J Endocrinol* 2000, **166**: 87-93.
3. Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y: **Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.** *Anat Rec* 1997, **248**: 76-83.
4. Quarmby VE, Korach KS: **The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus.** *Endocrinology* 1984, **114**: 694-702.
5. Finn CA, Publicover M: **Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.** *J Endocrinol* 1981, **91**: 335-340.
6. Martin L, Pollard JW, Fagg B: **Oestriol, oestradiol-17beta and the proliferation and death of uterine cells.** *J Endocrinol* 1976, **69**: 103-115.
7. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E: **Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**: 47.
8. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** *Nature* 1997, **388**: 300-304.
9. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS *et al.*: **A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 7787-7790.
10. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackenzie AE: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 1998, **17**: 3247-3259.
11. Asselin E, Wang Y, Tsang BK: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**: 2451-2457.
12. Asselin E, Mills GB, Tsang BK: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**: 1862-1868.
13. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB *et al.*: **Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-**

- trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.** *Science* 1998, **279**: 710-714.
14. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y *et al.*: **Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.** *Cancer Res* 2000, **60**: 5988-5994.
 15. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 8662-8667.
 16. Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D *et al.*: **Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.** *Cancer Res* 1999, **59**: 2551-2556.
 17. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E *et al.*: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**: 1318-1321.
 18. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN *et al.*: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.** *Genes Dev* 1997, **11**: 701-713.
 19. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y: **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **406**: 855-862.
 20. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T *et al.*: **Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.** *Nature* 2000, **408**: 1004-1008.
 21. Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**: 1-16.
 22. Prasad SC, Thraves PJ, Kuettel MR, Srinivasarao GY, Dritschilo A, Soldatenkov VA: **Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **249**: 332-338.
 23. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG: **Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis.** *J Cell Biol* 1997, **138**: 1379-1394.
 24. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M *et al.*: **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.** *Nature* 1995, **376**: 37-43.

25. Nephew KP, Ray S, Hlaing M, Ahluwalia A, Wu SD, Long X *et al.*: **Expression of estrogen receptor coactivators in the rat uterus.** *Biol Reprod* 2000, **63**: 361-367.
26. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 1999, **13**: 2905-2927.
27. Xiao CW, Ash K, Tsang BK: **Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *Endocrinology* 2001, **142**: 557-563.
28. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J: **Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *J Exp Med* 1998, **188**: 211-216.
29. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV: **Regulation of Ikb alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways.** *J Immunol* 1995, **155**: 4685-4691.
30. De M, Sanford TR, Wood GW: **Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone.** *Dev Biol* 1992, **151**: 297-305.
31. Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Tani A, Benvenuti S, Fiorelli G, Papucci L *et al.*: **17beta-estradiol induces apoptosis in the preosteoclastic FLG 29.1 cell line.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **255**: 680-685.
32. Patel H, Hoffman-Goetz L: **Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice.** *Acta Physiol Scand* 2002, **176**: 177-184.
33. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. **Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.** *Int J Oncol* 2003, **23**: 803-810.
34. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD: **Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli.** *Science* 2000, **288**: 874-877.
35. Pribluda VS, Gubish ER, Jr., LaVallee TM, Treston A, Swartz GM, Green SJ: **2-Methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate.** *Cancer Metastasis Rev* 2000, **19**: 173-179.

36. Schumacher G, Neuhaus P: **The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2001, **127**: 405-410.
37. Berg D, Sonsalla R, Kuss E: **Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an ¹²⁵I-labelled ligand.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983, **103**: 282-288.
38. Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M: **Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism.** *Hypertension* 2001, **37**: 640-644.
39. Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Rosselli M, Korzekwa KR, Fingerle J *et al.*: **Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of estradiol on vascular smooth muscle cells via estrogen receptor-independent mechanisms.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **278**: 27-33.
40. LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS *et al.*: **2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway.** *Cancer Res* 2003, **63**: 468-475.
41. Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW: **2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells.** *Cancer* 2001, **92**: 500-509.
42. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A: **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**: 601-604.
43. Foo SY, Nolan GP: **NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation.** *Trends Genet* 1999, **15**: 229-235.
44. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature* 1999, **399**: 601-605.
45. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K *et al.*: **Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.** *Nature* 1999, **399**: 597-601.
46. Pastorino JG, Tafani M, Farber JL: **Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositol-3-OH kinase-dependent pathway.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 19411-19416.
47. Pap M, Cooper GM: **Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 19929-19932.

48. van Weeren PC, de Bruyn KM, Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM: **Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 13150-13156.
49. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN: **Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level.** *J Cell Biol* 2000, **151**: 483-494.
50. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D *et al.*: **Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications.** *Oncogene* 2002, **21**: 5673-5683.
51. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al.*: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**: 857-868.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Cleaved caspase-3, -6, and -7 expression in rat endometrium during estrous cycle. Polyoestrus rats were sacrificed at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) and total endometrial proteins were collected. A) Western blots of cleaved caspase-3, -6 and -7 (one blot presented out of 4). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats). B) Immunohistochemistry of cleaved caspase-3. IHC shown are from one representative experiment (a total of four different uterine sections from four different rats per day of the estrous cycle have been tested).
*Significantly different from diestrus and proestrus ($p < 0.05$).

Figure 2 Smac/DIABLO and XIAP expression in rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). A) Western blots analyses of Smac/DIABLO and XIAP (one blot presented out of 6). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats).
*Significantly different from all other days of estrus cycle ($p < 0.05$).

Figure 3 Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium during estrous cycle. IHC shown are from one representative experiment carried out on four different uterine sections (a total of four different uterine sections from four different rats per day of the estrous cycle have been tested). Negative control: primary antibody absent.

Figure 4 Expression of cleaved caspase-3, -6, -7, Smac/DIABLO and XIAP in response to 17 β -estradiol (E₂) in ovariectomized rats. Ovariectomized rats received daily subcutaneous injections of E₂ (40mg/Kg/day) or vehicle for control group for 3 days. Graphics shows Western blots (one blot presented out of 4) densitometric analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (4 rats per group).

*Significantly different from control (p<0.05).

Figure 5 Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium of treated ovariectomized rats. Ovariectomized rats received daily subcutaneous injections of E₂ (40mg/Kg/day) or vehicle for control group for 3 days. IHC shown are from one representative experiment per group (a total of four different uterine sections from four different treated ovariectomized rats have been tested).

Figure 6 NF- κ B, I κ B and phospho-I κ B expression in rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). A) Western blots analyses of NF- κ B, I κ B and phospho-I κ B (one blot presented out of 6). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments (six different rats).

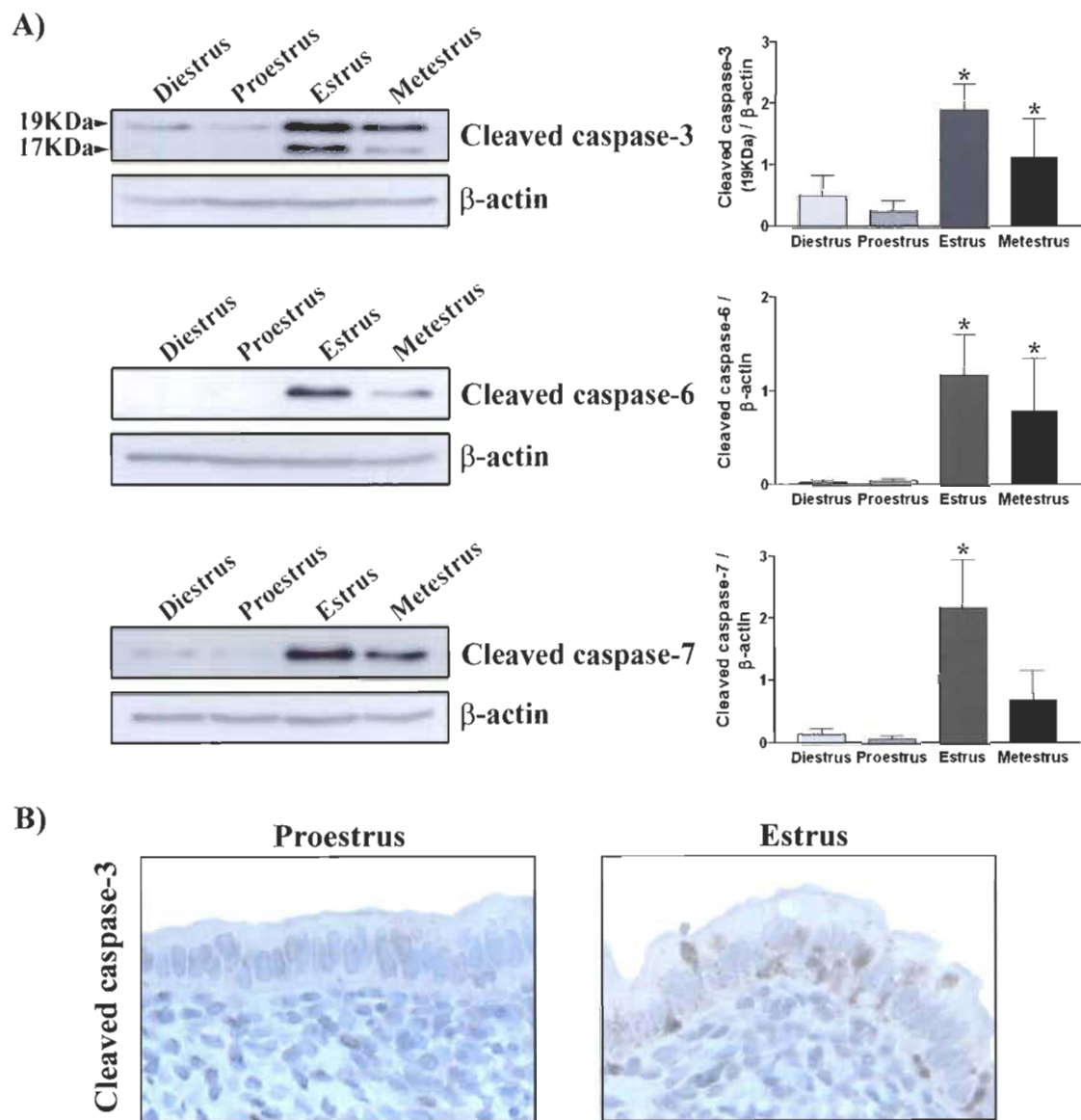


Figure 1 : Leblanc et al.

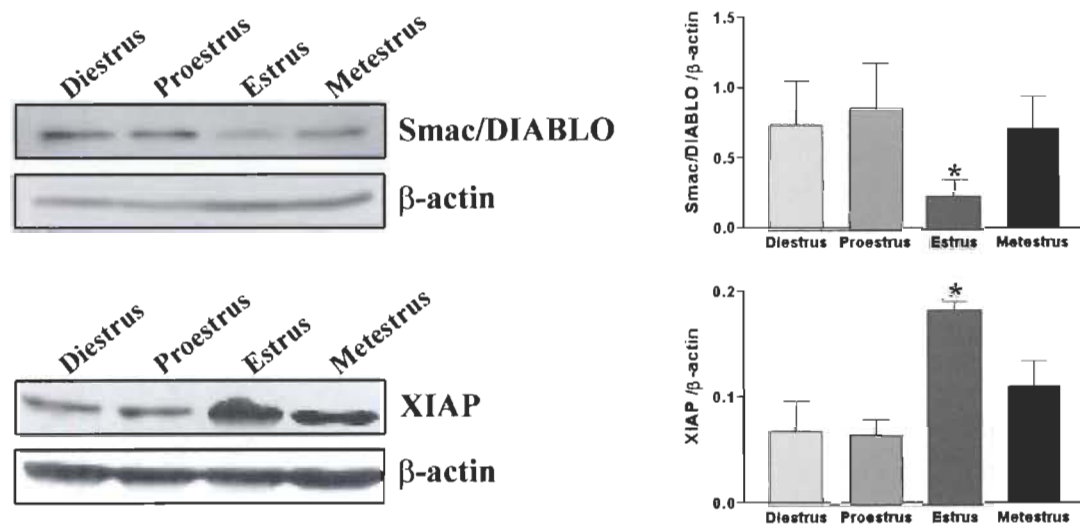


Figure 2 : Leblanc et al.

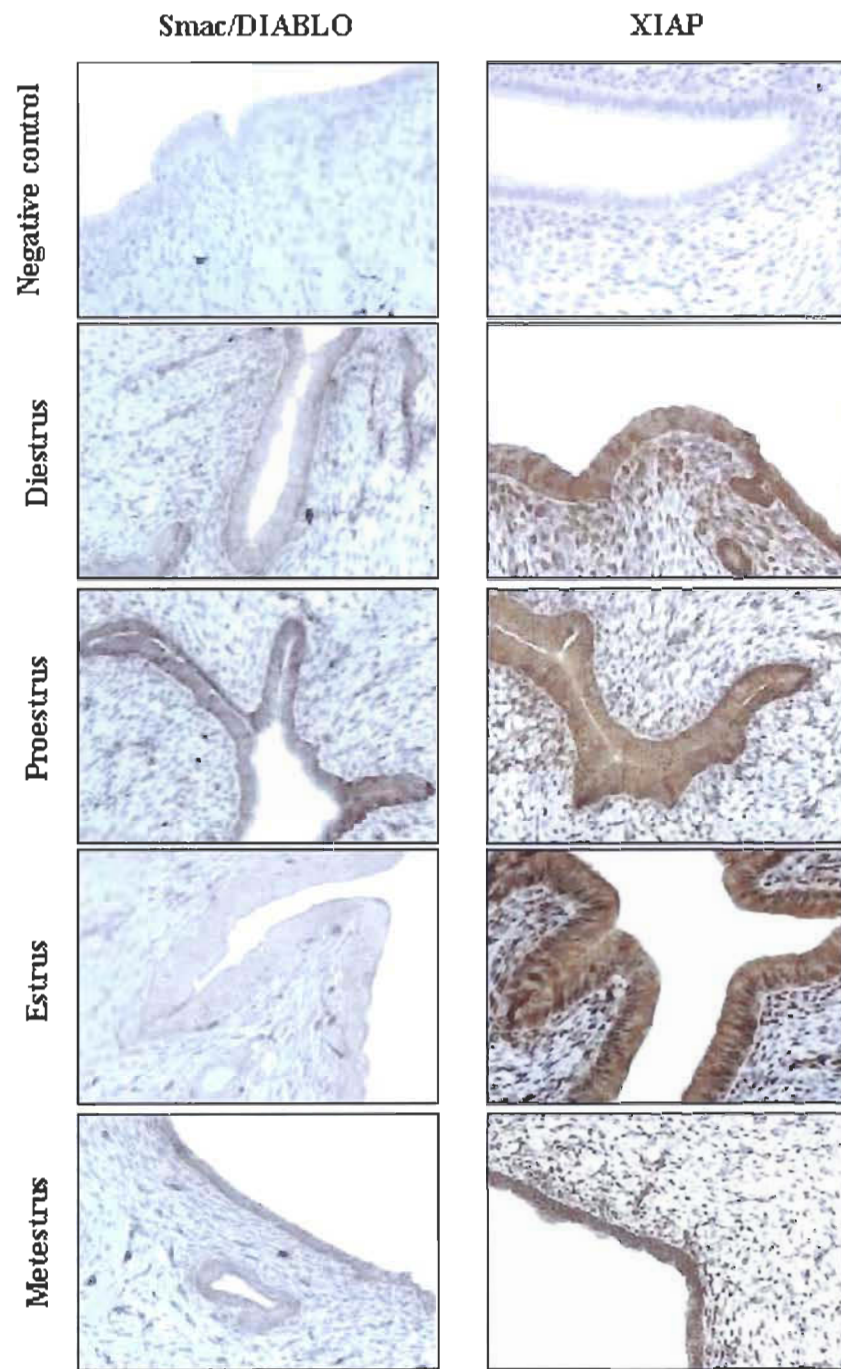


Figure 3 : Leblanc et al.

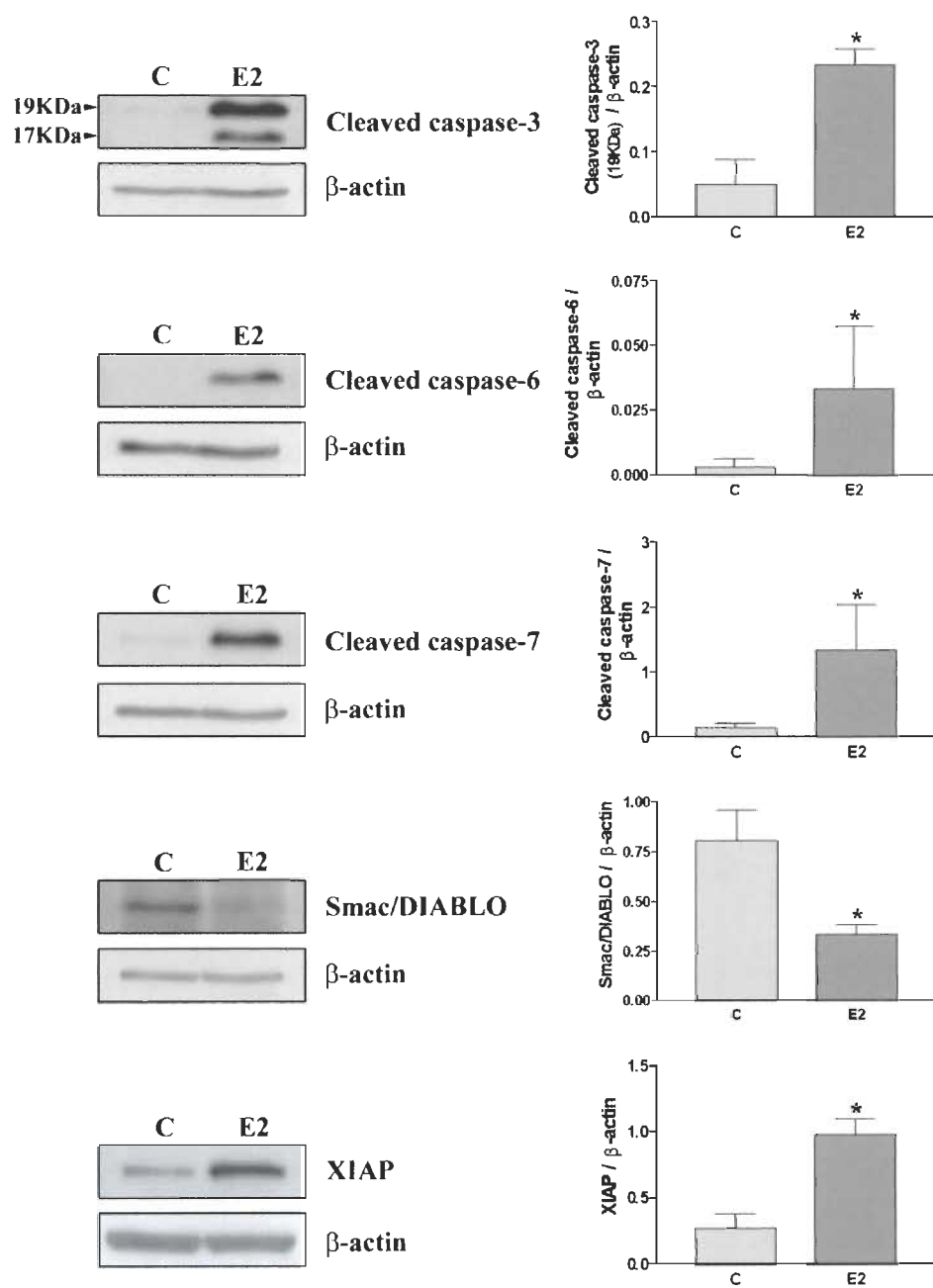


Figure 4 : Leblanc et al.

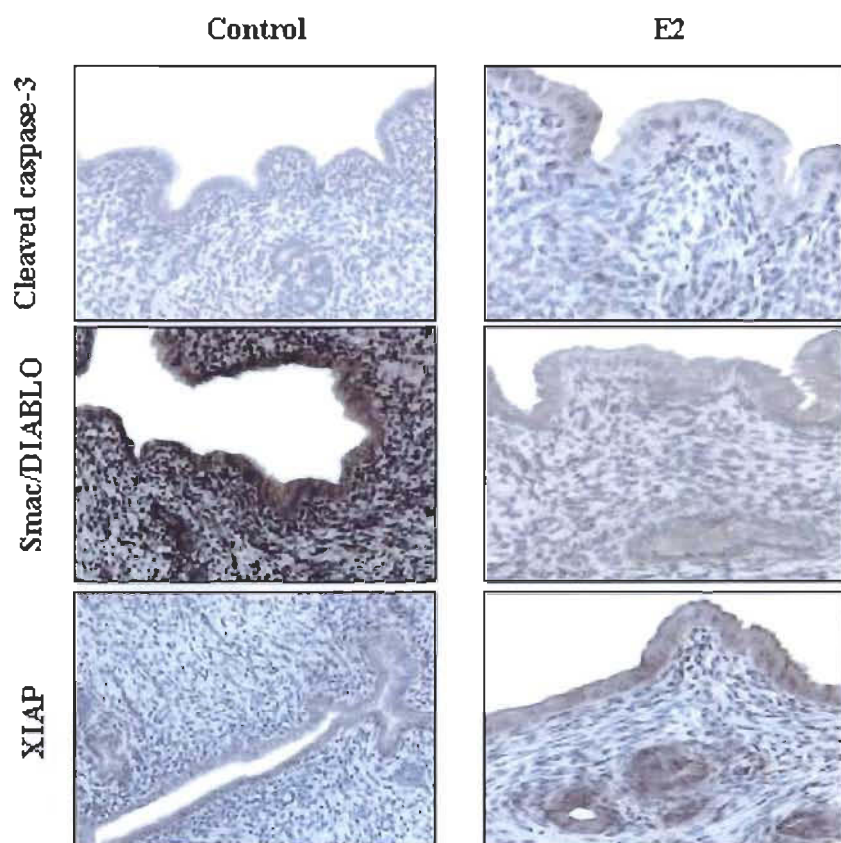


Figure 5 : Leblanc et al.

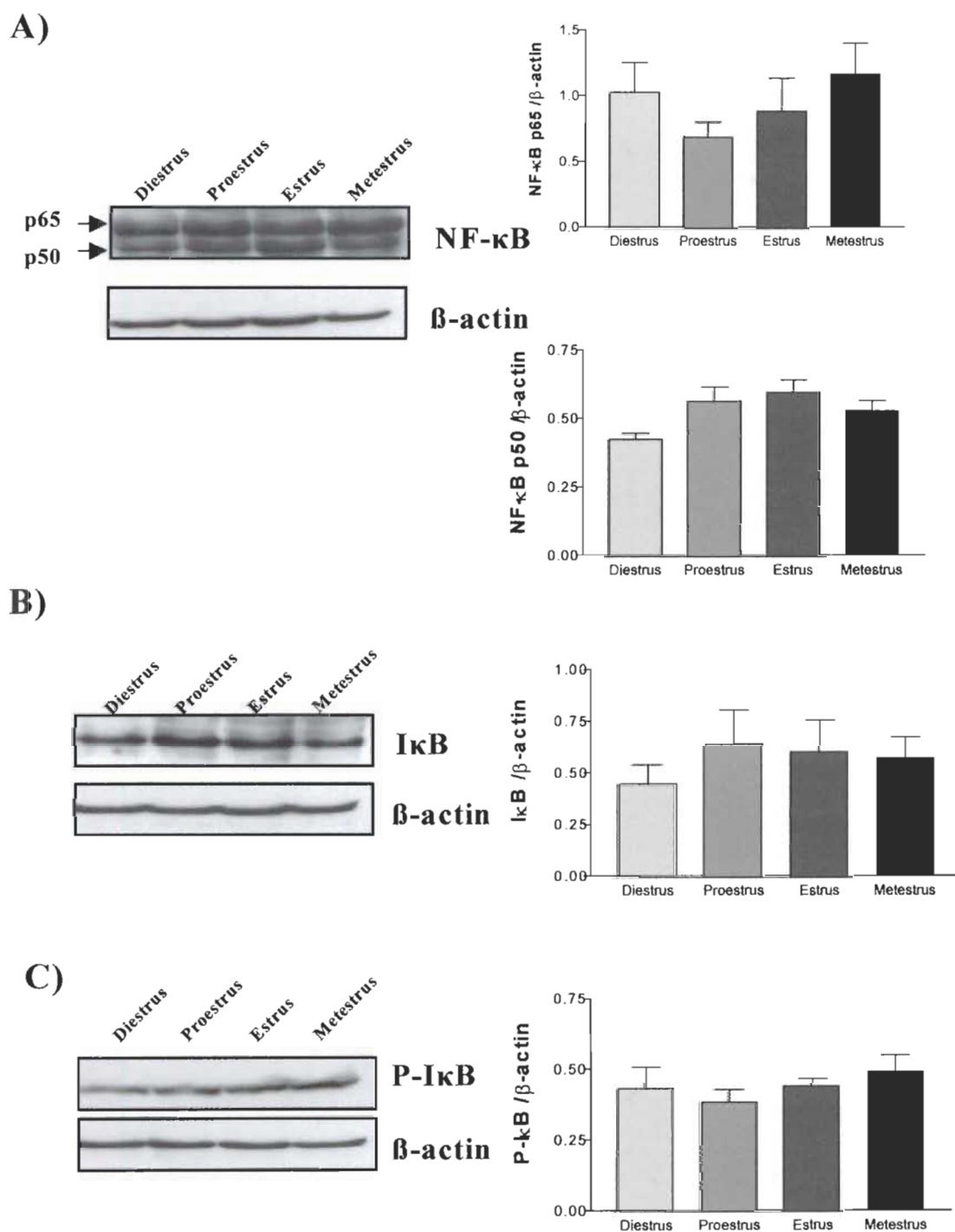


Figure 6 : Leblanc et al.

CHAPITRE 4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présence d'apoptose au niveau de l'endomètre lors du cycle oestral avait déjà été démontrée par d'autres équipes de recherche chez le rat (Lai et al., 2000, Sato et al., 1997) et chez la souris (Dharma et al., 2001). Lors de notre étude, nous avons réussi à mettre en évidence la présence de la protéine Akt, son activité et sa régulation par le 17 β -estradiol (E2) dans l'utérus du rat non gestant ainsi que la présence et la régulation opposée de XIAP et Smac/DIABLO. Akt est un facteur de survie cellulaire bien connu pour son implication dans l'inhibition de l'apoptose. D'un autre côté, Smac/DIABLO est relargué de la mitochondrie durant le processus apoptotique et promouvoit l'activation de la cascade des caspases en neutralisant les inhibiteurs apoptotiques de la famille des IAPs tels que XIAP. Cependant, on retrouve très peu d'information concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose au niveau de l'utérus dans la littérature. Même si les menstruations sont absentes chez les rongeurs, il doit exister des mécanismes intracellulaires précis qui coordonnent la régulation et la réparation des cellules endométriales après la chute des niveaux d'œstrogènes en l'absence de facteurs embryonnaires indiquant un début de grossesse. L'importance de l'expression et de la régulation de Akt et XIAP dans le processus de survie cellulaire et de la chimiorésistance a été démontré lors d'une étude sur les cellules du cancer ovarien humain (Asselin, Mills et al., 2001) et dans les cellules de la granulosa chez le rat (Asselin, Wang et al., 2001).

Tel que démontré par l'équipe de Sato (Sato al., 1997), l'apoptose est évidente dans les cellules épithéliales luminales en estrus et la prolifération est maximale en proestrus. On retrouve un niveau d'activité/phosphorylation élevé de Akt en proestrus comme nous l'avions supposé, fortement exprimé et localisé en bordure de l'épithélium et des glandes. L'activité/phosphorylation de Akt diminue en estrus lorsque la prolifération cellulaire est à son niveau le plus bas comme l'indique l'expression du CDC47/MCM7, un marqueur nucléaire de prolifération. Bien que le niveau de phosphorylation de Akt soit réduit en estrus, l'IHC nous révèle une distribution particulière de phospho-Akt à la surface interne de la membrane plasmique des cellules épithéliales luminales et ce,

principalement du côté faisant face à la lumière utérine. La translocation de phospho-Akt vers la membrane plasmique à partir du noyau et/ou du cytoplasme suggère dans ce cas que la présence de phospho-Akt au niveau de la membrane n'est pas suffisante pour permettre son activation afin assumer son rôle au sein de la voie de signalisation de survie cellulaire. Une étude récente a démontré que la translocation de Akt au niveau de la membrane est crucial pour l'activation physiologique de Akt par les kinases et peut aussi permettre une inactivation appropriée par les phosphatases (Andjelkovic et al., 1997). Un exemple de phosphatase impliquée est PTEN (phosphatase and tensin homologue tumor suppressor) (Stambolic et al., 1998), une lipide phosphatase retrouvée au niveau de la membrane plasmique (Iijima et al., 2002). PTEN déphosphoryle directement le PIP₃ lequel est essentiel pour la phosphorylation de Akt (Maehama et al., 1998). Les résultats de cette étude démontrent clairement que la protéine PTEN est présente dans l'endomètre et n'est pas influencée par les changements hormonaux qui surviennent lors du cycle oestral. En effet, le recrutement de Akt au niveau de la membrane pourrait être un mécanisme par lequel PTEN ou une autre phosphatase inconnue agit sur Akt et empêche son activation. La découverte d'une telle protéine pourrait éclaircir ce phénomène.

Puisque le niveau d'œstrogène est maximal en proestrus et diminue en estrus, nous avons utilisé des rates ovariectomisées pour déterminer l'implication possible du 17 β -estradiol, la forme la plus importante d'œstrogène, dans la régulation de la phosphorylation de Akt. Akt et l'œstrogène sont impliqués dans la régulation et la médiation de différents systèmes de signalisation cellulaire comme EGF, IGF-1 et la GH (Martin et al., 2000, Shoba et al., 2001), eNOS (Simoncini et al., 2002) et la FSH (Gonzalez-Robayna et al. 2000). La présente étude démontre clairement une augmentation de la phosphorylation de Akt en réponse au 17 β -estradiol. Tel que démontré dans d'autres systèmes (Hisamoto et al. 2001), il est possible que l'activation du récepteur de l'œstrogène puisse activer la phosphorylation de Akt par un mécanisme de signalisation encore inconnu dans l'endomètre. L'expression de la protéine PTEN demeure constante au cours du cycle oestral indiquant que PTEN est une protéine exprimée constitutivement. Dans l'endomètre humain, PTEN est régulée par la

progestérone (Mutter et al., 2000). Contrairement au cycle menstruel de la femme, l'utérus chez la rate ne connaît pas d'épisodes de décidualisation durant son cycle oestral. La protéine PTEN semble être plus importante au moment de l'implantation de l'embryon chez le rat lorsque le processus de décidualisation a été amorcé que lors du cycle oestral.

Dans notre étude, l'expression de XIAP est maximale en estrus et augmente en réponse au 17β -estradiol chez les rates ovariectomisées. XIAP est fortement exprimée dans l'épithélium glandulaire et luminal ainsi qu'au niveau du stroma durant l'estrus probablement pour protéger ces cellules de l'apoptose. Puisque la stimulation de XIAP par le 17β -estradiol est compatible avec l'activité mitotique et l'inhibition de l'apoptose, la raison pour laquelle l'expression de XIAP n'augmente pas durant le proestrus demeure obscure. Une récente étude de l'équipe de Xiao (Xiao et al., 2001) a démontré que XIAP peut être directement régulé par la présence de TNF- α (tumor necrosis factor α) dans les cellules de la granulosa. Depuis, il a été démontré que l'expression de l'ARN messager de TNF- α est élevée en estrus et est régulée par l'œstrogène dans l'utérus de la souris (De M et al., 1997). Nous supposons qu'un processus similaire pourrait être impliqué dans l'endomètre chez le rat, ce qui pourrait constituer une perspective de recherche à notre étude. Il faudrait donc vérifier si l'action du 17β -estradiol sur XIAP est directe ou implique d'autres facteurs de croissance et/ou des cytokines.

En ce qui concerne Smac/DIABLO, son expression diminue en proestrus et les traitements au 17β -estradiol effectués sur les rates ovariectomisées voient son expression considérablement réduite. Ces résultats supportent directement l'effet mitotique des œstrogènes sur les cellules endométriales. Bien que Smac/DIABLO soit une protéine pro-apoptotique, sa rétro-inhibition peut être suffisante pour activer XIAP et inhiber l'activité des caspases. Cette rétro-inhibition confirme nos résultats obtenus en estrus démontrant que l'apoptose prédomine largement dans les cellules épithéliales lumineales (Déry et al., 2003) et suggère que ce facteur pro-apoptotique puisse jouer un rôle primordial à ce stade du cycle oestral. Aucune information dans la littérature ne démontrait à ce jour que le 17β -estradiol pouvait moduler l'expression de

Smac/DIABLO comme nos résultats l'ont démontré. Le traitement au 17β -estradiol résulte en un clivage des caspase 3, 6 et 7 des cellules endométriales. Ces résultats sont contradictoires avec le fait que le 17β -estradiol induit la prolifération des cellules endométriales plutôt que l'induction de l'activation de la cascade des caspases et l'apoptose. Malgré le fait que le 17β -estradiol peut induire l'apoptose dans les cellules préostéoclastiques *in vitro* (Zecchi et al., 1999) et dans les thymocytes des souris ovariectomisées *in vivo* (Patel et al., 2002), il est peu probable que le 17β -estradiol induit l'apoptose au niveau de l'endomètre. L'explication la plus plausible voudrait que les cellules endométriales en phase latente, chez les rates ovariectomisées, soient forcées de proliférer suivant l'injection du 17β -estradiol, ce qui seraient un facteur de stress cellulaire important. L'équilibre entre les facteurs de survie et de mort cellulaire est un processus crucial dans le maintien de l'homéostasie de l'endomètre. L'augmentation du clivage ou de l'activation des caspases n'est pas nécessairement un signe de l'enclenchement de l'apoptose : l'activité des caspases peut être bloquée par la présence d'une quantité importante de XIAP ou d'une autre protéine inhibitrice de la famille des IAPs (Gagnon et al., 2003) et la présence d'un faible niveau de Smac/DIABLO. Ce mécanisme particulier des cellules endométriales peut être important pour rapidement induire l'apoptose à un moment très précis du cycle, par exemple en estrus, par une simple inhibition ou dégradation de la protéine XIAP par une protéine ligase ubiquitine.

La présence et l'activité d'un métabolite du 17β -estradiol pourrait fournir une autre explication à l'activation des caspases. Le 2-Methoxyestradiol (2ME2) est un métabolite naturel du 17β -estradiol qui agit comme un agent inhibiteur de l'angiogénèse et possiblement comme un agent antitumoral (Pribluda et al., 2000). L'équipe de Schumacher a démontré que le 2ME2 a la capacité d'induire l'apoptose dans plusieurs types de cellules (Schumacher et al., 2001) et est présentement sous essais cliniques comme thérapie anticancéreuse. Il induit l'apoptose suite au recrutement et à l'activation des caspases 8, 9 et 3 (LaVallee et al., 2003). Il serait intéressant de pousser nos investigations sur 2ME2 pour déterminer comment le 17β -estradiol pourrait être impliqué dans l'induction du clivage des caspases dans l'endomètre du rat et vérifier la possibilité que l'activation des caspases observée puisse ne pas être sous l'influence

directe du 17 β -estradiol. Des études récentes ont démontré que le facteur nucléaire transcriptionnel kappa-B (NF- κ B) est une cible directe de Akt phosphorylé (Kane et al., 1999). NF- κ B est séquestré (sous-unités p65 et p50) dans le cytoplasme par les inhibiteurs I κ Bs lesquels sont phosphorylés par Akt. Suite à la phosphorylation, les I κ Bs sont libérés et dégradés par ubiquitination et NF- κ B peut pénétrer au niveau du noyau pour l'expression de gènes (Foo et al., 1999). Dans la littérature, nous avons trouvé que le promoteur de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) est activé par NF- κ B (Stehlik et al. 1998, Xiao et al. 2001). Nous avons démontré dans notre étude l'activation de Akt en réponse au 17 β -estradiol dans l'endomètre du rat tandis que l'équipe de Kane (Kane et al., 1999) a démontré qu'Akt activait la voie cellulaire de NF- κ B. Suite à cela, nous avons voulu savoir si la voie Akt/ NF- κ B/ I κ B pouvait être impliqué dans la régulation de l'expression de XIAP. Nos résultats montrent clairement qu'il n'y a pas de différence dans l'expression de NF- κ B, I κ B ou la phosphorylation de I κ B durant les quatre stades du cycle oestral, ce qui exclu donc l'implication de cette voie dans la régulation de XIAP ou de Smac/DIABLO. Une étude a rapporté dernièrement que IGF-1 (insulin-like growth factor-1) induisait l'activation de Akt, de NF- κ B et la phosphorylation du facteur de transcription Forkhead (FKHR), lequel provoque une activation d'une série de protéines antiapoptotiques intracellulaires tels que XIAP (Mitsiades et al., 2002). Puisque FKHR est aussi une cible bien connue de l'action de Akt (Brunet et al., 1999), la phosphorylation, l'activité et la régulation de ce facteur de transcription dans l'utérus devrait faire l'objet d'investigations futures dans notre laboratoire.

En résumé, nos résultats démontrent pour la première fois la présence et la régulation de la protéine Akt dans l'endomètre du rat durant le cycle oestral et que ce facteur de survie cellulaire est régulé par le 17 β -estradiol. Le niveau d'expression de la protéine est élevé en estrus tandis que sa forme activée par phosphorylation est à son plus niveau le plus bas. PTEN qui normalement empêche la phosphorylation de Akt, ne démontre aucune régulation durant le cycle, ce qui nous conduit à suspecter l'activité d'une phosphatase inconnue. On a pu constater la translocation de Akt au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales luminales, seulement en estrus. Akt régule l'activité de la voie

de NF-kappaB, un facteur de transcription nucléaire impliqué, entre autre, dans l'expression de XIAP. Cette voie, à l'instar de PTEN, ne montre aucune régulation significative durant le cycle. XIAP en tant que protéine anti-apoptotique aurait dû atteindre une expression maximale en proestrus et minimale en estrus, toutefois, nous avons obtenu des résultats contraires. Smac/DIABLO, un inhibiteur de XIAP, est exprimé assez fortement en métestrus, diestrus et proestrus mais faiblement en estrus. Cela pourrait expliquer les résultats obtenus au niveau de XIAP. XIAP pourrait donc jouer un rôle important dans la protection des cellules endométriales contre l'apoptose sans discrimination.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Cette étude se voulait être un premier pas vers la compréhension des mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation de l'apoptose au niveau de l'endomètre chez la rate. Si nous avons été quelque peu surpris par certains résultats, ceux-ci soulèvent toutefois de nouvelles questions intéressantes qui constituent des perspectives de recherches. Est-ce que l'action du 17β -estradiol sur XIAP est directe ou implique d'autres facteurs de croissance ? Quel impact pourrait avoir 2ME2, un métabolite du 17β -estradiol, sur notre système ? D'où vient l'activité phosphatase inconnue qui déphosphoryle Akt en estrus ? Est-ce que XAF-1 qui séquestre XIAP au niveau du noyau pourrait intervenir durant le cycle ? Également, des investigations sur le $TNF\alpha$, le IGF-1 et la voie de FKHR pourrait nous fournir des réponses intéressantes et améliorer notre compréhension sur la régulation de l'apoptose au niveau de l'endomètre chez le rat.

RÉFÉRENCES

Adams JM, Cory S (1998) "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival", *Science* 281: 1322-1326

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1", *Embo J.* 15: 6541-6551

Alessi DR, James SR, Downws Cp, Holmes AB, Gaffney PR, Reese Cb, Cohen P (1997) "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase alpha", *Curr. Biol.* 7 (4), 261-9

Alhemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW e al.(1996) "Human ICE/CED-3 protease nomenclature", *Cell* 87: 171

Ambrosini G, Adida C, Alteiri DC (1997) "A novel anti-apoptosis gene, surviving, expression cancer and lymphoma", *Nat. Med.* 3:917-921

Ameisen JC (1996) "The origin of programmed cell death", *Science* 272, 1278-1279

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq MJ, Hemmings BA (1997) "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B", *J Biol Chem* 272: 31515-31524

Antonsson C, Conti F, Ciavatta A, Montessui TS, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997) "Inhibition of BAX channel-forming activity by Bcl-2", *Science* 277: 370-372

Arcaro A, Wymann MP (1993) "Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate in neutrophil response", *Biochem J.* 296 (Pt2) 297-301

Ashkenazi A, Dixit VM (1998) "Death receptors: signaling and modulation", *Science* 281 (5381) 1305-8

Asselin E, Mills GB, Tsang BK (2001) " XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells", *Cancer res.* 61: 1862-1868

Asselin E, Wang Y, Tsang BK (2001) "X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development", *Endocrinology* 142: 2451-2457

Ballard DW, Dixon EP, Peffer WJ, Bogerd H, Doerre S, Stein B, Green WC (1992) "The 63 kDa subunit of human NF-Kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1875-9

Bazer FW, Ott TL, Spencer TE (1998) "The endocrinology of pregnancy", Humana Press inc, Totowa, NJ, chapter 1

Bellacosa A, Franke TF, Gonzalez-Portal ME, Datta K, Taguchi T, Gardner J, Cheng JQ, Testa JR, Tsichlis PN (1993) "Structure expression and chromosomal mapping of c-Akt: Relationship to v-Akt and its implications", *Oncogene* 8: 745-754

Brown DG, Sun XM, Cohen GM (1993) "Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 26, No 5, 3037-3039

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Sybenlist U (1995) "Control of kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation", *Science* 267: 1485-8

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS et al.(1999) "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor", *Cell* 96: 857-868.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvasen GS, Francke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation", *Science* 282: 1318-1321

Chai JJ, Du CY, Wu JW, Kyin S, Wang XD, Shi YG (2000) "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO" *Nature* 406: 1004-1008

Chen LF, Fischle W, Verdin E, Green WC (2001) "Duration of nuclear NF-KappaB action regulated by reversible acetylation", *Science* 293: 1653-7

Clark EA, Brugge JS (1995) "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." *Science* 268: 233-239

Coffer PJ, Woodgett JR (1991) "Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families", *Eur. J. Biochem.* 201: 475-481

Cryns V, Yuan J (1998) "Proteases to die for", *Genes & Development* 12: 1551-1570

Curie RA, Walker KS, Gray A, Deah M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J (1999) " Role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in regulating the activity and localization for 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1" *Biochem J.* 337: 575-583

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) "Cellular survival: a play in three Acts", *Genes & development* 13 :2905-2907

Datta SR, Greenberg ME, "Molecular mechanisms of neuronal survival and apoptosis in hormones and signaling", Ed. B. O'Malley, Academic Press, San Diego, CA

De M, Sanford TR, Wood GW (1992) "Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone", *Dev Biol* 151: 297-305

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) "Phosphoinositide-3-OH-kinase-dependant regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B /Akt by the integrin-linked kinase", *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (19), 11211-6

Deng Y, Lin Y, Wu X (2002) "Trail-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO", *Genes & Development* 16:33-45

Devereaux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsch K, Salseven GS, Reed JC (1999) "Cleavage of human inhibitor of apoptotic protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases", *Embo J.* 18: 5242-5251

Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E (2003) "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle", *Reprod Biol Endocrinol* 1: 47 (13 pages)

Devereaux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Almenri ES, Salseven GJ, Reed JC (1998) "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases", *Embo J.* 17:2215-2223

Devereaux QL, Takahashi R, Salsbery GS, Reed JC (1997) "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases", *Nature* 388: 300-304

Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD (2001) "Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle", *Indian J. Exp Biol* 39: 218-222

DiDonato JA, Mercurio F, Karim M (1995) "Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-KappaB", *Mol. Cell Biol.* 1302-111

Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB (1998) "Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death", *Oncogene* 17: 3207-3213

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) "Smac, a mitochondrial protein that promote cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition 2, *Cell* 102: 33-42

Earnshaw WC (1995) "Nuclear changes in apoptosis", *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 337-343

Fadok VA, Voelker Dr, Campbell PA et al. (1992) "Exposure of phosphatidylserines on the surface of apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by macrophages", *J. Immunol.* 148 :2207-2216

Fannings As, Anderson JM (1999) "Protein modules as organizers of membrane structure", *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 432-439

Farahani R, Fong WG, Korneluk RG, Mackenzie AE (1997) "Genomic organization and primary characterization of mIAP-3: the murine homologue of human X-linked IAP", *Genomics* 42: 514-518

Foo SY, Nolan GP (1999) "NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation", Trends Genet 15: 229-235

Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ, Neill JD (1994) "Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy", Endocrinology 94 : 875-882.

Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E (2003) "Akt activity in endometrial cancer cells: Regulation of cell survival through cIAP-1", Intern. Journal of Oncology 23 :0-00

Gajewski TF, Thompson CB (1996) "Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence", Cell 87 (4) 589-92

Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L (2000) "Ligand-activates progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFB-1 (insulin-like-growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells", Mol. Endocrinol. 14: 1954-1961

Garcia-Calvo M, Peterson ER, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, Thornberry NA (1999) "Purification and catalytic properties of human caspase family members", Cell death Differ. (4) 362-9

Gartner, Hiatt (1992) "Atlas d'histologie en couleurs", 2e Edition, De Boeck University, Bruxelles, Belgique

Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H (1999) "The tumor suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region", Proc Natl Acad Sci USA Vol 96, 10182-10187

Gerschenson LE, Rotello RJ (1992) "Apoptosis: a different type of cell death", *FASEB J.* 6: 2450-2455

Geske FJ, Gerschenson LE (2001) "The biology of apoptosis", *Hum. Pathol.* 32: 1029-1038

Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000) "Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PBK/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signalling by FSH in granulosa cells", *Mol. Endocrinol.* 14: 1283-1300

Green D, Kroemer G (1998) "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria ?", *Trends Cell Biol* 8 :267-271

Green DR (1998) "Apoptotic pathways: the roads to ruin", *Cell* 94: 695-698

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer JC (1998) "Enforced demerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis", *Embo J.* 17: 3878-3885

Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S (1998) "A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitor" *J. Cell. Biol.* 141:1415-1422

Hayashi T, Schine T, Okamoto T (1993) "Identification of a new serine kinase that activates NF-kappa B by direct phosphorylation", *J. Biol. Chem.* 268: 26790-5

Hinchliffe K, Irvine R (1997) "Inositol lipid pathways turn turtle". *Nature* 390 (6656) 123-4

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y (2001) "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthetase in vascular endothelial cells", *J. Biol Chem* 276: 3459-3467

Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997) "The CARD domain: a new apoptotic signalling motif", *Trends Bioch. Sci.* 22: 155-156

Hou S, Hancheng G, Ricciardi RP (2003) "Phosphorylation of serine S337 of NF-kappaB p50 is critical for DNA binding", *J. Biol. Chem.* ?

Ibelgaufts, Horst (june 2003) "Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia", University Phillipines, URL: www.copewithcytokines.de/cope.cgi?368

Iijima M, Devreotes P (2002) "Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients", *Cell* 109: 599-610

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase", *Curr. Biol* 9: 601-604

Kasof GM, Gomes BC (2001) "Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member", *J.Biol. Chem.* 276: 3238-3246

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR et al. (1997) "The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis", *Science* 275: 1132-1136

Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT (1997) "A specific product of phosphatidylinositol 2-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain", *Mol Cell Biol* 17 :338-344

Knobil E, Neill JD (1994) "The physiology of reproduction", Second Edition, Volume 1, Raven Press, USA

Kohn AD, Tokeuchi F, Roth RA (1996) "Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation", J Biol Chem 271: 21920-21926

Krege JH, Hodgin JB, Course JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF et al. (1998) "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15677-15682

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997) "Mitochondrial control of apoptosis", Immunol Today 18: 44-51

Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LY (2000) "Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus", J Endocrinol 166: 87-93

Larousse, Bordas (1998) "Dictionnaire Médical Larousse", Paris, France

Lee J, Yang H, Georgescu MM, DiCristafano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP (1991) "Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association", Cell 99: 323-334

Levasseur MC, Thibault C., (2001) "La reproduction chez les mammifères et l'homme", 2e Édition, Ellipses Edition Marketing SA, Paris, France

Li LY, Luo Y, Wang X (2001) "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria", Nature 412: 95-99

Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW (2001) "2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells", *Cancer* 92: 500-509.

Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG (2001) "Identification of XAF-1 as an antagonist of XIAP anticaspase activity", *Nature Cell Biology* Vol 3 , February

Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McClean M, Iheda JE, Mackenzie A, Korneluk RG (1996) "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes", *Nature* 379: 349-353

LiuX, Zou H, Slaughter C (1997) "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis", *Cell* 89:175-184

Liu X, Kim CN, Yang J et al. (1996) "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c", *Cell* 86 :147-157

Liu Z, Sin CH, Olyniczak ET, Meadow RP, Betz SF, Oost T, Hermann J, Wu JC, Fesih SW (2000) "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR 3 domain", *Nature* 408: 1004-1008

Maehama T, Dixon JE (1998) "The tumor suppressor PTEN/MMAC 1, dephosphorylates the lipid second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate", *J. Biol. Chem.* Vol 273, No 22, 13375-13378

Marieb EN (1999) "Anatomie et Physiologie Humaine", 2e Édition française, Edition Erpi

Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olivo SE, Stoica A (2000) "A role for Akt in mediating the estrogenic

functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1", *Endocrinology* 141: 4503-4511

May MJ, Ghosh S (1997) "Rel/NF- κ B and I κ B proteins: An overview", *Semin. Cancer Biol.* 8: 63-73

McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S (1989) "Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes", *FASEB J.* 3, 1843-1849

Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D et al. (2002) "Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications", *Oncogene* 21: 5673-5683

Mittl PR, DiMarco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, Grutter MG (1997) "Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone", *J. Biol. Chem.* 272 (10) 6539-47

Monier JC, Auger C, Rigal D, Fabien N, Université de Lyon , Département Immunologie, URL: [//nte-serveur.univ-lyon1.fr/immuno/](http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/immuno/)

Musacchio A, Gibson AT, Rice P, Thompson J, Saraste M (1993) "The PH domain: a common piece in the structural pathwork of signaling proteins", *Trends. Biochem. Sci.* 18: 343-348

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) "Interaction of 14-3-3 with signalling proteins is mediated by the recognition of phosphoserines", *Cell* 84: 889-897

Mutter GI, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C (2000) "Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle" *J. Clin Endocrinol Metab* 85: 2334-2338

Myers MP, Pass I, Batty IH, Vander Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK (1998) "The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13513-13518

Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC (1993) "Targeting of bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence", *J. Biol. Chem.* 268: 25265-25268

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) "Bcl-2 heterodimerizes in vivo a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death", *Cell* 74:609-619

Pahl HL (1999) "Activators and target genes of Rel/NF-Kappa B transcription factors" *Oncogene* 18: 6853-66

Parrish JJ (9 juin 2000) "Animal Science 434 – reproductive physiology", University Wisconsin-Madison URL: www.wisc.edu/ansci_repro.

Patel H, Hoffman-Goetz L (2002) "Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice", *Acta Physiol Scand* 176: 177-184.

Pribluda VS, Gubish ER, Jr., LaVallee TM, Treston A, Swartz GM, Green SJ (2000) "2-Methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate", *Cancer Metastasis Rev* 19: 173-179.

Rizo J, Sudhof TC (1998) "C2 domains, structure and function of a universal C2+ - binding domain", *J. Biol. Chem.* 273:15879-15882

Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y (1997) "Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina", *Anat. Rec.* 248: 76-83.

Schumacher G, Neuhaus P (2001) "Physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors", *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 405-410.

Segal RA, Greenberg ME (1996) "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors", *Annu. Rev. Neurosciences* 19: 463-489

Sen C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunashera HH, Hermann J, Wu Jc, Fesih SW (2000) "NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP", *J. Biol. Chem.* 275: 33777-33781

Shoba LN, Newman M, Liu W, Lowe WL (2001) "LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-1 gene in rat hepatocytes", *Endocrinology* 142: 3980-3986

Simonici T, Varone G, Fornari L, Mannella P, Luisi M, Labrie F, Genazzani AR (2002) "Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator", *Endocrinology* 143:2052-2061

Slee EA, Harte MT, Kluck RM et al. (1999) "Ordering the cytochrome c initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8 and 10 in a caspase-9 dependent manner", *J. Cell. Biol.* 144: 281-292

Snijders MP, De Goeij AF, Debets-Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koustaal J, Bosman FT (1992) "Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle after the menopause", *J. Rep. Fertil.* 94: 363-371

Sonenshein GE (1997) "Rel/NF- κ B transcription factors and the control of apoptosis" Trends. Can. Biol 8:113-119

Song Z, Steller H (1999) "Death by design: Mechanism and control of apoptosis", Trends Biochem. Sci. 24: M49-M52

Staal SP (1987) "Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologs Akt1 and Akt2: Amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5034-5037

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN", Cell 95: 29-39

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J (1998) "Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis", J Exp Med. 188: 211-216

Stennicke HR, Devereaux QL, Hunske EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS (1999) "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing", J. Biol. Chem. 274 (13) 8359-62

Stephens LR, Hughes KT, Irvine RF (1991) "Pathway of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate synthesis in activated neutrophils", Nature 351 (6321) 33-9

Stroh C, Schulze-Osthoff K (1998) "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates", Cell death Differ. 5:997-1000

Takahashi R, Devereaux QL, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salseven GS, Reed JC (1998) "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases", *J. Biol. Chem.* 273: 7787-7790

Tibbets M, Zheng L, Lenardo MJ (2003) "The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis", *Nature Immunology* 4: 404-409

Torres J, Pulido R (2001) "The tumor suppressor PTEN was phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implication for PTEN stability to proteasome-mediated degradation", *J. Biol. Chem.* 276: 993-998

Tseng L, Zhu HH (1997) "Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells", *Biol. Rep.* 57: 1360-1366

Tsujimoto Y (1998) "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria ?", *Genes Cells* (11) 697-707

Vasquez F, Ramaswamy D, Nakamura N, Sellers WR (2000) "Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function", *Mol. Cell. Biol.* 20: 5010-5018

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)", *J. Biol. Chem.* 269 (7), 5241-8

Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS (2000) "Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of Rel/A/p65 on Ser 529 is controlled by casein kinase II", *J. Biol. Chem.* 275: 32592-7

Waynforth HB, Flecknell PA (1992) "Experimental and surgical technique in the rat", Second Edition, Academic Press, London, Angleterre

Weiner JA, Chun J (1999) "Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. April 27, 96 (9)

Wolf BB, Grenn DR (1999) "Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases", *J. Biol. Chem.* 274: 20049-20052

Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CI (1998) "The PTEN/MMAC 1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(26) 155887-91

Wymann MP, Pirola L (1998) "Structure and function of phosphoinositide 3-kinases", *Biochemica et Biophysica Acta* 1436, 127-150

Xiao CW, Ask K, Tsang BK (2001) "Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis", *Endocrinology* 142: 557-563

Yang J, Liu X, Bhalla K et al. (1997) "Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked", *Science* 275 :1129-1132

Yang Y, Fang SY, Jensen IP, Wersmann AM, Ashwell JD (2000) " Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in protéasomes in response to apoptotic stimuli", *Science* 288: 874-877

Yao R, Cooper GM (1995) "Requirement for phosphatidyl inositol-3 kinase in prevention of apoptosis by the nerve growth factor", *Science* 267 :2003-2005

Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Tani A, Benvenuti S, Fiorelli G, Papucci L et al.(1999) "17beta-estradiol induces apoptosis in the preosteoclastic FLG 29.1 cell line", *Biochem Biophys Res Commun* 255: 680-685.

Zhu L, Ling S, Yu XD et al. (1999) "Modulation of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis by bcl-2", J. Biol. Chem. 274: 33267-33273

Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW (1996) "Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types", Embo J. 15: 4130-4141